

THYAGO VANDERLINDE

**DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO DE CORTE EM DUAS  
ESPÉCIES DO GRUPO *cardini* DE *Drosophila* (DIPTERA:  
DROSOPHILIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação  
em Ciências Biológicas do Centro de  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Santa Catarina como  
requisito parcial para a obtenção do  
grau de Bacharel e Licenciado em  
Ciências Biológicas, sob a orientação  
da Professora Doutora Daniela Cristina  
De Toni e co-orientação do Doutor  
Luís Eduardo Maestrelli Bizzo.

Florianópolis

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vanderlinde, Thyago

Descrição do comportamento de corte em duas espécies do grupo cardini de *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) / Thyago Vanderlinde ; orientadora, Daniela Cristina De Toni ; coorientador, Luis Eduardo Maestrelli Bizzo. - Florianópolis, SC, 2014.

61 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Comportamento animal. 3. Evolução. 4. *Drosophila*. 5. Morfometria geométrica. I. De Toni, Daniela Cristina. II. Bizzo, Luis Eduardo Maestrelli. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

THYAGO VANDERLINDE

**DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO DE CORTE EM DUAS  
ESPÉCIES DO GRUPO *cardini* DE *Drosophila* (DIPTERA :  
DROSOPHILIDAE)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 25 de julho de 2014.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Risoleta Freire Marques  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

**Banca examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Cristina De Toni  
Presidente

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Norma Machado da Silva

Membro titular

---

Bacharel em Ciências Biológicas Bruna Wildemann  
Membro titular

---

Prof. Dr. Victor Hugo Valiati  
Suplente



## AGRADECIMENTOS

A Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela De Toni, por ter sido a primeira pessoa a abrir as portas de seu laboratório, um laboratório que foi muito mais que um ambiente de trabalho, mas um lugar de amizade e carinho. Por ter dedicado seu tempo e paciência em me ensinar e por todos os conselhos e conversas. E é claro por todos os lanches deliciosos!

Ao Prof<sup>º</sup> Dr Luís Eduardo Maestrelli Bizzo, obrigado por aceitar me orientar, sem sua grande ajuda este trabalho não seria possível. Agradeço por mesmo em meio a tantos compromissos e aulas ter dedicado parte do seu tempo para me orientar.

A Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Norma Machado Silva, que foi a última se juntar a nossa equipe e que apesar de não ter trabalhado diretamente neste projeto, ajudou muito em meu desenvolvimento como pesquisador. Também agradeço por ter aceitado o convite para fazer parte da banca deste trabalho.

A Indjara Probst, a primeira pessoa a me mostrar as drosófilas! Dedicou muito do seu tempo a me ensinar sobre estas mosquinhas tão simpáticas. Foram estes primeiros passos como drosofilista que me levaram a este trabalho.

Ao Prof<sup>º</sup> Dr Paulo Hofmann, por sempre estar disposto a ajudar e ensinar. Ensinou muito além dos conteúdos da sala de aula e do laboratório, principalmente sobre o rigor científico e a escrita acadêmica.

Aos labsters, Bruna, Mauro e Michele, que compartilharam comigo boa parte do tempo no laboratório. Em especial a Bruna, por ter aceitado ser parte da banca.

Aos meus pais, Bernardo e Marieli, por terem dado todo o suporte, carinho e compreensão. Além disso, certamente vocês deram mais apoio financeiro que qualquer agência de fomento. Sem vocês nada teria sido possível.

A minha grande amiga Elisa, pela amizade sincera e incondicional, mesmo com a vida tendo nos levado para longe nunca perdemos o contato e os laços de amizade.

Aos amigos da minha turma 09.2, especialmente Piera, Jairo, Alceu, Adriana, Rafael e Gabi. Obrigado por me acompanharem nas disciplinas e dividirem tantos momentos ao longo dos últimos 5 anos.

Ao longo da graduação conheci muitos alunos de outras fases. Na 09.1, fiz muitas disciplinas e ganhei muitos amigos. Primeiramente, a Bia, porque ela gosta de ser a primeira e não esconde que não liga que eu tenha outros amigos, desde que ela seja a favorita, é claro! Acima de tudo, obrigado por estar sempre presente. Ao Renato, que apesar de não gostar de mim no começo do curso, hoje é como um irmão e companheiro de muitas histórias. Também agradeço a Mime, Mayara e Ricardo pela companhia em vários momentos.

Outra turma muito marcante foi a 10.2 e alguns agregados. Foram meus primeiros monitorandos e certamente os meus favoritos! Em especial ao Xuxa, Diego, Flavia, Brunão, Carol, Thiago, Letícia, João, Luiza, Mauricio e Jonata. Obrigado pelos inúmeros bons momentos. Um agradecimento especial a Camila, que já foi parte da equipe do nosso laboratório e trabalhou comigo no início deste projeto.

As calouras Gabi Oms e Mari Bessel, que na verdade nem são mais calouras, mas já estou muito velho e acho que todos são calouros. Chegaram por último, mas dividimos ótimos momentos.

É claro que eu não poderia deixar de agradecer a Prici, que mesmo sem ter feito Biologia é mais bióloga que muita gente por aí. Apesar da distância física, nunca nos distanciamos! Obrigado por ser uma super amiga.

Ao Lucas, que não importa quantos anos se passem, para mim, sempre será um Neno. Obrigado pela amizade. Também agradeço ao Arthur, que mesmo chegando no último semestre me fez dar muitas risadas e foi companheiro de muitas histórias

Ao Prof<sup>o</sup> Dr Victor Valiati, por ter gentilmente aceitado colaborar com este trabalho na elaboração do projeto e agora fazer parte da banca.

## RESUMO

Foram observados 200 casais de *Drosophila cardinoides* e 200 casais de *Drosophila polymorpha* a fim de descrever o comportamento de corte destas espécies. A análise foi feita pela observação dos casais por um tempo mínimo de 50 minutos, ou até que o casal terminasse a cópula. Ambas as espécies demonstraram ser extremamente similares e seguiram os comportamentos já descritos para o gênero. Esta observação permitiu também determinar os tempos médios de latência, corte e cópula em 4,5 min, 12 min e 18 min para *D. cardinoides* e 3,5 min, 17 min e 26 min para *D. polymorpha*. A avaliação do comportamento de corte como barreira reprodutiva em *Drosophila* já foi bastante estudada dentre as espécies do grupo *melanogaster*. Estes dados foram importantes para o desenvolvimento desta área, mas não exprimem necessariamente toda a variação encontrada no gênero. Trabalhos feitos com espécies do grupo *cardini* sobre hibridização exploraram apenas as questões associadas a morfologia das moscas e negligenciavam outras barreiras reprodutivas como, por exemplo, o comportamento. As observações feitas neste trabalho sugerem que a corte não deva ser uma barreira reprodutiva importante entre estas espécies. Pois, além das já conhecidas semelhanças morfológicas, estas espécies apresentam muitas semelhanças comportamentais na corte. Dentre as variações observadas na corte das espécies de *Drosophila*, uma das principais é a forma de vibração das asas. Os sons desta vibração são produzidos por complexos movimentos das asas associados a forma da mesma. A covariação entre a forma da asa e o sucesso do acasalamento tem sido descrito para várias espécies de *Drosophila*. Por isso, dados da morfometria geométrica das asas contribuem muito para o entendimento de como variações na forma das asas influenciam no acasalamento e o sucesso reprodutivo dos indivíduos. As correlações entre tamanho macho/fêmea de casais com e sem sucesso na cópula de *D. cardinoides* e *D. polymorpha* não foram significativas. Do mesmo modo, não há diferença no tamanho médio entre os machos que conseguiram ou não copular. Tais dados levam a pensar que a relação entre o tamanho do corpo e o sucesso masculino é complexa e pode não ser tão forte como pensado inicialmente, sugerindo que a seleção sexual direcional para aumento do tamanho do corpo masculino não é universal em *Drosophila*.

**Palavras-chave:** *Drosophila cardinoides*. *Drosophila polymorpha*. Isolamento reprodutivo. Morfometria geométrica da asa. Especiação.



## ABSTRACT

In order to describe the courtship behavior of *Drosophila cardinoides* and *D. polymorpha*, 200 couples of each species were observed. The couples were observed for at least 50 minutes, or until the end of copulation. Both species were shown to be extremely similar, following the behavior already described for the genus. This observation also allowed us to determine the average latency, courtship and copulation times, being 4.5 min, 12 min and 18 min, respectively, for *D. cardinoides* and 3.5 min, 17 min and 26 min for *D. polymorpha*. The assessment of courtship behavior in *Drosophila* as a reproductive barrier has been widely studied among the species of the *melanogaster* group. These data were important for the development in this area, but do not necessarily express the whole range found within the genre. Previous work involving hybridization of species from the *cardini* group only explored the issues associated with the flies' morphology and neglected other reproductive barriers such as the behavior. The observations made in this study suggest that the courtship should not be a major reproductive barrier between these species. Therefore, besides the well-known morphological similarities, these species present many behavioral similarities in courtship. A major form of courtship variation observed in *Drosophila* species is related to the wing fluttering. Complex wing movements associated with its shape are responsible for producing a vibration sound. The covariation between wing shapes and mating success has been reported for various species of *Drosophila*. Therefore, data from geometric morphometric wings contribute a lot to the understanding as to how variations in wing shape influence the mating and reproductive success of the studied individuals. According to our results, there is no significant correlation between male/female size and success in copulation for *D. cardinoides* and *D. polymorpha*. Also, no differences in mean size were observed between copulating and non copulating flies. Such data leads us to assume that the relationship between body size and male success is complex and may not be as strong as originally thought, suggesting that directional sexual selection related to increasing male body size is not universal in *Drosophila*.

**Keywords:** *Drosophila cardinoides*. *Drosophila polymorpha*. Reproductive isolation. Wing Geometric Morphometry. Speciation.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 O COMPORTAMENTO DE CORTE .....	14
1.2 O GRUPO <i>cardini</i> .....	17
1.3 OBJETIVOS.....	20
1.3.1 Objetivo geral .....	20
1.3.2 Objetivos específicos.....	20
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
2.1 AS LINHAGENS .....	23
2.2 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE CORTE .....	24
2.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	26
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
3.1 O COMPORTAMENTO DE CORTE DE <i>Drosophila</i> <i>cardinoides</i> E <i>Drosophila polymorpha</i> .....	29
3.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS ASAS DOS CASAIS DE <i>Drosophila cardinoides</i> E <i>Drosophila polymorpha</i> .....	33
<b>4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A especiação ocorreu bilhões de vezes desde o início da vida e está entre os eventos mais importantes da história dos seres vivos. Ela foi um processo central na teoria darwiniana da evolução e ainda hoje permanece no centro da biologia evolutiva (Anderson e Kim, 2005). O principal evento na especiação é a divisão de uma população de organismos em uma ou mais subpopulações que se tornam reprodutivamente isoladas umas das outras.

Como o isolamento reprodutivo proposto por Dobzhansky (1937) é a chave para a definição genética de uma espécie, considerando-se o conceito biológico, o entendimento dos mecanismos de isolamento reprodutivo foi essencial para a estruturação da teoria sintética da evolução, desenvolvida na década de 40.

Grupos de espécies que habitam o mesmo território podem ser reprodutivamente isolados uns dos outros por diversos mecanismos (Snustad e Simmons, 2008). Existem dois principais tipos de mecanismos de isolamento biológico: os pré-zigóticos e os pós-zigóticos. Aqui serão abordados, com mais detalhes, apenas os mecanismos pré-zigóticos, aqueles que ocorrem quando há uma falha em formar zigoto (Griffiths *et al.*, 2008) também chamados de mecanismos de reforço, que operam impedindo a reprodução entre indivíduos de populações diferentes (Snustad e Simmons, 2008).

Podemos classificar três processos que atuam no isolamento pré-zigótico: o isolamento mecânico (1), no qual a fecundação não é possível devido a diferenças morfológicas entre as populações, ou seja, há um impedimento físico da relação sexual entre elas. O isolamento comportamental (2), no qual, embora a relação sexual seja possível sob o ponto de vista mecânico, ela não ocorre devido à rejeição de contato de indivíduos de outras espécies. E o temporal ou sazonal (3) que acontece quando os indivíduos de uma espécie têm diferente época de amadurecimento sexual à da outra espécie (Mayr, 1963). É importante salientar que geralmente nenhuma dessas barreiras é absoluta, geralmente as várias barreiras agem em conjunto para levar ao isolamento de duas espécies.

Estes mecanismos foram descritos primeiramente em organismos modelo e depois sofreram generalizações para os demais seres vivos. Um modelo muito utilizado para estudar o isolamento reprodutivo foi o das moscas do gênero *Drosophila*. Há muito tempo, *Drosophila* tem

sido amplamente utilizada para o estudo de aspectos evolutivos no acasalamento dentro e entre populações (Markow, 1987). Para se ter uma ideia, já em 1952, Patterson e Stone catalogaram mais de 100 casos de hibridização (cruzamento entre espécies diferentes) em *Drosophila*, realizados em laboratório, e desde então os estudos evolutivos com estas moscas se multiplicaram.

Na maioria dos estudos realizados em animais foi verificado que, a prole híbrida tem menor aptidão e quando há a formação do zigoto, muitas vezes, estes morrem ou tornam-se adultos estéreis (Hatfield e Schluter, 1999; Via *et al.*, 2000; Rundle *et al.*, 2000). Consequentemente, deveria haver uma forte seleção a favor de cruzamentos preferenciais dentro das populações.

Nas últimas décadas, o estudo das barreiras reprodutivas tem ganhado maior destaque. Em especial após a publicação dos trabalhos de Coyne e Orr (1989; 1997), que demonstraram que em *Drosophila* as barreiras pré-zigóticas tendem a surgir antes das barreiras pós-zigóticas. Isto tem implicações profundas no entendimento do processo evolutivo, pois até então as barreiras pré-zigóticas eram entendidas como um subproduto das barreiras pós-zigóticas (Coyne e Orr, 2004). Estes trabalhos sugeriram que as barreiras pós-zigóticas atuam no reforço e acentuação das barreiras pré-zigóticas preexistentes.

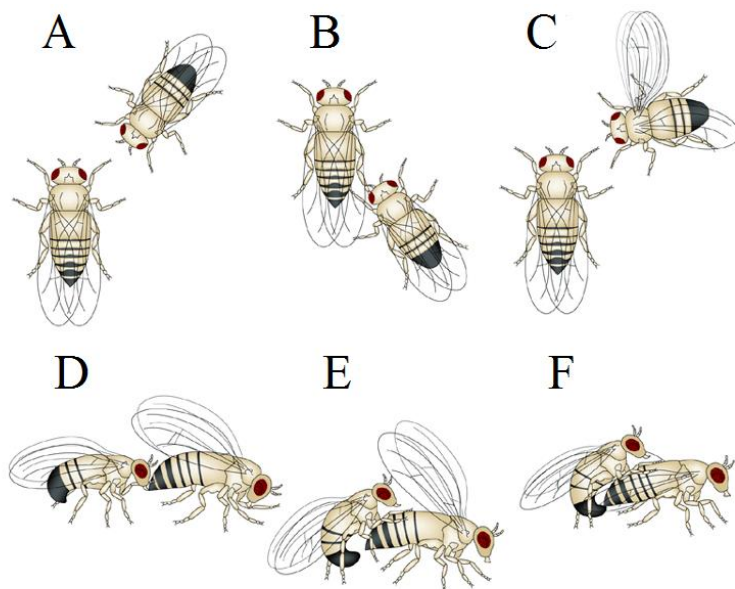
## 1.1 O COMPORTAMENTO DE CORTE

Talvez uma das barreiras mais bem estudadas em *Drosophila* seja a corte que precede a cópula, em que o macho se aproxima, realiza uma série de movimentos, e a fêmea responde, aceitando ou rejeitando a cópula. Espécies de *Drosophila* diferem amplamente em seus níveis de diversidade genética, natureza e força da seleção em diferentes *loci* (Markow e O'Grady, 2008). Devido a toda essa variabilidade estas espécies apresentam grande diversidade nos padrões da corte que precedem a cópula (Gleason *et al.*, 2012).

O comportamento de acasalamento é um complexo de sinais (Hebers e Papaj, 2005), o qual, no gênero *Drosophila*, envolve basicamente uma aproximação e corte do macho, a resposta da fêmea e, finalmente, a rejeição do macho ou a cópula. Foi demonstrado que este comportamento de *Drosophila* é um importante componente do *fitness* e está relacionado a diferentes aspectos como a fecundidade, fertilidade e longevidade dos indivíduos (Hedge e Krishna, 1999).

Inicialmente, os machos localizam as fêmeas e começam a fazer a corte, que pode durar de alguns segundos a alguns minutos. A corte envolve diversos comportamentos espécie-específicos (Lasbleiz *et al.*, 2006), no entanto, geralmente, o macho realiza uma "dança", movimentando as asas e o corpo ao redor da fêmea (Figura 1 A e B), de modo a mostrar seu vigor físico (Dockendorf *et al.*, 2002). Os machos emitem também sinais químicos, como os feromônios sexuais de contato chamados de CHCs, os hidrocarbonetos cuticulares (Ganter *et al.*, 2012). O padrão sonoro das batidas das asas também é bastante característico de cada espécie (Figura 1C) e determinante para o sucesso da corte (Brown, 1965).

**Figura 1.** Esquema de corte apresentado por *Drosophila melanogaster*. **A.** O macho localiza a fêmea **B.** Dá batidas nas pernas da fêmea **C.** Produz sons de corte com a vibração das asas **D.** Finalmente o macho lambe a genitália da fêmea **E.** Curva seu abdômen **F.** Efetiva a cópula (Adaptado de Sokolowski, 2001).



Em alguns casos, o macho pode também apresentar comportamento agressivo em relação a outros machos, ou ainda

estimular a fêmea, por meio de pequenas batidas no abdômen ou até "lamber" a genitália feminina (Figura 1D) (Müller *et al.*, 2012). As fêmeas podem aceitar ou rejeitar a corte, e caso aceite, ela se posiciona à frente do macho, que curva seu abdômen (Figura 1E) e monta sobre ela (Figura 1F), finalmente realizando a cópula (Jennions e Petrie, 1997).

Existem evidências de que os comportamentos acima descritos também podem ser aprendidos. Fêmeas podem aprender a escolher os machos de maior vigor e machos podem aprender a cortejar melhor as fêmeas, tanto pela visualização de outros casais como pela experiência (Polejack e Tidon, 2007).

É importante ressaltar que a avaliação do comportamento de corte e das barreiras reprodutivas em *Drosophila* já foi bastante estudada entre as espécies do grupo *melanogaster*. Estes dados foram importantes para o desenvolvimento desta área, mas não exprimem necessariamente toda a variação encontrada no gênero.

Dentre as variações observadas na corte das espécies de *Drosophila*, uma das principais é a forma de vibração das asas. Os sons desta vibração são produzidos por complexos movimentos das asas associados a forma da mesma. A covariação entre a forma da asa e o sucesso do acasalamento tem sido descrito para várias espécies de *Drosophila* (Monclus e Prevosti, 1971; Wilkinson, 1987; Naseerulla e Hedge, 1992; Hedge e Krishna, 1997; Yenissetti e Hedge, 2003). Dados da morfometria geométrica das asas podem contribuir muito para o entendimento de como variações na forma das asas influenciam no acasalamento e o sucesso reprodutivo dos indivíduos.

Alguns estudos testaram a influencia do tamanho do macho no sucesso da corte. Partridge *et al.* (1987) observaram que machos de *D. melanogaster* encontrados copulando na natureza, eram maiores que os machos que não estavam copulando. Além disso, esses autores propuseram que machos maiores podem ter vantagem na competição intra-sexual por fêmeas receptivas, pois estes machos são mais rápidos e mais ativos, sendo assim, encontrariam maior número de fêmeas receptivas, ou seriam mais hábeis em se aproximar das fêmeas durante a corte. Santos *et al.* (1988) também observaram que as fêmeas de *D. buzzatii* tem maior sucesso quando acasalam com indivíduos maiores.

No Brasil, existem diversos trabalhos que tratam do isolamento reprodutivo entre espécies de *Drosophila* brasileiras. Alguns antigos com as espécies grupo *willistoni* (Winge, 1965) outros, mais recentes,



com espécies do *cluster buzzatii*, do grupo *repleta* (Bizzo, 1983; Machado *et al.*, 2002) e *bromeliae* (Schmitz, 2010).

Outra importância do estudo do comportamento para o isolamento é o fato de que, geralmente, não é possível fazer análise genética dos mecanismos de isolamento entre duas espécies pelo simples motivo de que, por definição, elas não podem ser cruzadas umas com as outras. No entanto é possível fazer uso de espécies próximas, nas quais mecanismos de isolamento ainda não produziram uma esterilidade completa e degeneração do híbrido (Griffiths *et al.*, 2008).

## 1.2 O GRUPO *cardini*

O grupo *cardini*, primeiramente descrito por Sturtevant (1942), está inserido no subgênero *Drosophila*. Conta com 16 espécies nominalmente descritas e habitantes de diferentes áreas Neotropicais (Tabela 1). O grupo está dividido em dois subgrupos denominados *dunni* e *cardini* (Heed e Krishnamurthy, 1959), que apresentam padrões evolutivos distintos e interessantes.

As espécies do subgrupo *cardini* são as mais antigas do grupo, as quais divergiram entre si a mais de 6,6 milhões de anos atrás (Brisson *et al.*, 2006). No entanto, apesar de o grupo *cardini* ser considerado monofilético (Hataadani *et al.*, 2009), este subgrupo foi sustentado como parafilético, pelas últimas filogenias baseadas em marcadores moleculares (Brisson *et al.*, 2006), o que já era esperado devido ao fato de que o subgrupo *dunni* foi separado do restante, pelo critério de pigmentação abdominal, no padrão de inversões cromossômicas e na distribuição geográfica (Heed e Krishnamurthy, 1959), enquanto o subgrupo *cardini* simplesmente ficou com todas as outras espécies que não pertenciam a este primeiro subgrupo (Heed, 1962).

Até hoje, *D. cardinoides*, *D. parthenogenetica* e *D. procardinoides* são um problema não resolvido na filogenia do subgrupo *cardini*. Essas espécies foram originalmente agrupadas pela similaridade da genitália masculina e por relatos de hibridizações em laboratório (Heed, 1962). Análises moleculares apontam que elas parecem ser mais recentes e por isso ainda apresentam muitas variações em *loci* nucleares e mitocondriais. Este fato pode propiciar hibridizações destas espécies em áreas de simpatria (Brisson *et al.*, 2006). Na natureza só haviam sido detectadas áreas de simpatria entre *D. cardinoides* e *D. parthenogenetica* na América Central. Posteriormente, estas espécies

tiveram relatos de ocorrência até a América do Sul (De Toni *et al.*, 2005), o que indica que há áreas de simpatria muito mais abrangentes para potenciais hibridizações entre estas espécies

**Tabela 1.** Distribuição do grupo *cardini* (Adaptado de Brisson *et al.*, 2006).

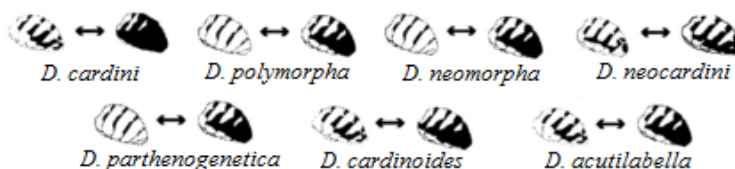
Espécie	Subgrupo	Distribuição
<i>D. bedicheki</i> <i>D. cardini</i> <i>D. cardinoides</i> <i>D. parthenogenetica</i> <i>D. neomorpha</i> <i>D. polymorpha</i> <i>D. neocardini</i> <i>D. procardinoides</i> <i>D. acutilabella</i>	<i>cardini</i>	Trinidad Florida ao Brasil México ao Brasil México ao Brasil México ao Brasil América do Sul América do Sul Andes da Bolívia e Peru Florida, Cuba, Jamaica e Hispaniola
<i>D. antillea</i> <i>D. arawakana</i> <i>D. belladunni</i> <i>D. caribiana</i> <i>D. dunni</i> <i>D. nigrodunni</i> <i>D. similis</i>	<i>dunni</i>	St. Lucia St. Kitts a Dominica Jamaica Martinique Porto Rico e St. Thomas Barbados St. Vincent e Grenada

O grupo *cardini* é também caracterizado pelo alto polimorfismo de pigmentação de abdômen (Figura 2), que não só se refere à intensidade da pigmentação, mas também ao padrão da pigmentação entre os membros da mesma espécie. Acima de tudo, chama a atenção que esta característica, tão frequente neste grupo, é incomum para *Drosophila* (Stalker, 1953).

Este grupo tem sido estudado desde a década de 1940, com trabalhos sobre sua taxonomia e distribuição (Sturtevant, 1942; Dobzhansky e Pavan, 1943; Stalker, 1953), polimorfismos de pigmentação abdominal (Da Cunha *et al.*, 1953; Hollocher *et al.*, 2000ab; Machado *et al.*, 2001; Brisson *et al.*, 2005) e relações evolutivas (Martinez e Cordeiro, 1970; Heed e Russell, 1971; Napp e

Cordeiro, 1981; Robe *et al.*, 2005; Brisson *et al.*, 2006; Cenzi de Ré *et al.*, 2010).

**Figura 2.** Polimorfismo de pigmentação de abdômen nas diferentes espécies do grupo *cardini* (Adaptado de Brisson *et al.*, 2006).



Estudos genéticos realizados por Heed e Krishnamurthy (1959) oferecem uma excelente oportunidade para estudar efeitos do isolamento, especialmente quando os estudos podem ser feitos em laboratório. Neste mesmo trabalho, fica evidente a existência de clinas na variação da pigmentação abdominal no subgrupo *dunni*. A razão adaptativa para tal fato é desconhecida, embora estudos realizados com outras espécies de *Drosophila* (Paynat, 1986) sugiram que moscas mais pigmentadas seriam protegidas de dessecação em regiões de clima mais frios. A base fisiológica da vantagem das formas mais escuras de *Drosophila* que ocorreriam no frio e das mais claras, no calor, permanece não compreendida.

O grupo de pesquisa liderado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Valente, da UFRGS, foi responsável pelos primeiros estudos brasileiros sobre a variabilidade cromossômica no grupo *cardini*, na década de 1990. Desde então, diversas inversões foram descritas para as espécies do grupo (Rhode e Valente, 1996; De Toni *et al.*, 2001; Wildemann e De Toni, 2011).

A natureza do polimorfismo cromossômico em dípteros, especialmente em *Drosophila*, é claramente adaptativa (Dobzhansky, 1943; 1947a; 1947b; 1948; Dubinin e Tiniakov, 1945; Dobzhansky e Levene, 1948; 1951; Stalker e Carson, 1948). Sendo estes polimorfismos cromossômicos adaptativos e balanceados, a quantidade de polimorfismos presente em uma espécie deve ser em função do maior número e variedade de nichos ecológicos que suas populações ocupam (Da Cunha *et al.*, 1950; 1959; Da Cunha e Dobzhansky, 1954). Além disso, vários estudos sugerem que os rearranjos cromossômicos, como as inversões, podem facilitar a evolução do isolamento reprodutivo

(Noor *et al.*, 2001; Rieserberg, 2001; Navaroo e Barton, 2003; Sweigart, 2009). No entanto estudos deste tipo não existem para o grupo *cardini*, o que gera uma lacuna no entendimento sobre a relação entre a evolução cariotípica do grupo e seu processo de especiação.

Estudos de polimorfismos cromossômicos em *D. polymorpha* e *D. cardinoides* mostraram que a primeira é mais polimórfica que do que a segunda (Da Cunha *et al.*, 1953). Ainda, foi notado que *D. polymorpha* é relativamente mais comum no sudeste do Brasil do que *D. cardinoides*, isso porque esta última espécie estaria associada à proximidade de habitações humanas, já que em áreas não impactadas sua frequência é inferior a 1% (Da Cunha *et al.*, 1953; Gottschalk *et al.*, 2007).

Os trabalhos que tratam de barreiras reprodutivas no grupo *cardini* foram realizados por um grupo americano nas décadas de 1960 e 1970 e são quase que restritos ao subgrupo *dunni*. No entanto, ainda muito pouco se sabe sobre as barreiras reprodutivas neste subgrupo em que há grandes áreas de simpatria entre espécies (Vilela *et al.*, 2002), e portanto o acasalamento interespecífico é mais provável.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo documentar os diferentes comportamentos de corte em *Drosophila cardinoides* e *Drosophila polymorpha*

### 1.3.2 Objetivos específicos

Descrever o comportamento de corte de *D. cardinoides* e *D. polymorpha*.

Descrever os tempos de latência, corte e cópula nas duas espécies.

Analisar as diferenças comportamentais entre espécies do grupo *cardini* e o restante do gênero a partir de dados da literatura.

Avaliar a importância da barreira reprodutiva comportamental no isolamento destas espécies.

Analisar a importância do tamanho do macho para o sucesso da cópula.

Analisar se a relação entre o tamanho do macho e da fêmea de cada casal é determinante para o sucesso da cópula.

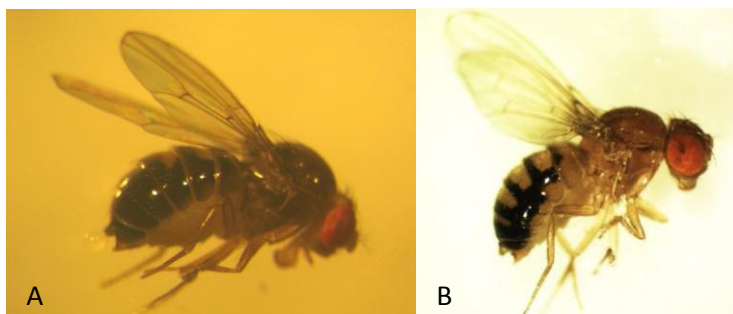


## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 AS LINHAGENS

Foram utilizadas duas linhagens de *Drosophila cardinoides* (Figura 3A) e duas de *Drosophila polymorpha* (Figura 3B) do estoque do Laboratório de Drosofilídeos da Universidade Federal de Santa Catarina. As linhagens de *D. polymorpha* foram coletadas no Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (Figura 4A) e na Reserva Biológica Estadual do Aguaí (Figura 4C). Já ambas as linhagens de *D. cardinoides* são provenientes da localidade do Ribeirão da Ilha, Florianópolis, em uma região que faz parte do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (Figura 4B).

**Figura 3.** As duas espécies utilizadas. **A.** *Drosophila cardinoides* **B.** *Drosophila polymorpha*.



Amostras das populações de *Drosophila* foram obtidas a partir da captura de indivíduos adultos com rede entomológica sobre recipientes com isca de banana fermentada com *Saccharomyces cerevisiae* deixadas por no mínimo três dias na área de coleta. Capturas com o uso de armadilhas preparadas com garrafa pet (Tidon e Sene, 1988) também foram eventualmente realizadas.

Para a identificação taxonômica de *D. polymorpha* e *D. cardinoides*, foram realizadas rápidas anestésias em gás carbônico (CO<sub>2</sub>) que permitiam a observação dos indivíduos sob microscópio estereoscópico. Por meio da identificação de características morfológicas peculiares das espécies (chave classificatória de Freire-

Maia e Pavan, 1949) e também através da dissecação de genitália masculina, quando necessário, seguindo a técnica de Wheeler *et al.* (1966) as espécies foram determinadas.

**Figura 4.** Mapa de Santa Catarina, ressaltando os pontos de coleta. **A.** Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (27°48'20"S; 48°33'50"W) **B.** Ribeirão da Ilha, Florianópolis (27°48'30.46"S; 48°33'27.34"W) **C.** Reserva Biológica Estadual do Aguai (28°25'33,86"S; 49°32'39,61"W).



As linhagens estudadas foram fundadas utilizando-se uma única fêmea fértil coletada na natureza. A prole de cada fêmea foi mantida como um *pool* à 22 °C em meio de cultura de batata liofilizada (Bizzo *et al.*, 2012) e alimentadas semanalmente com fermento biológico.

## 2.2 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE CORTE

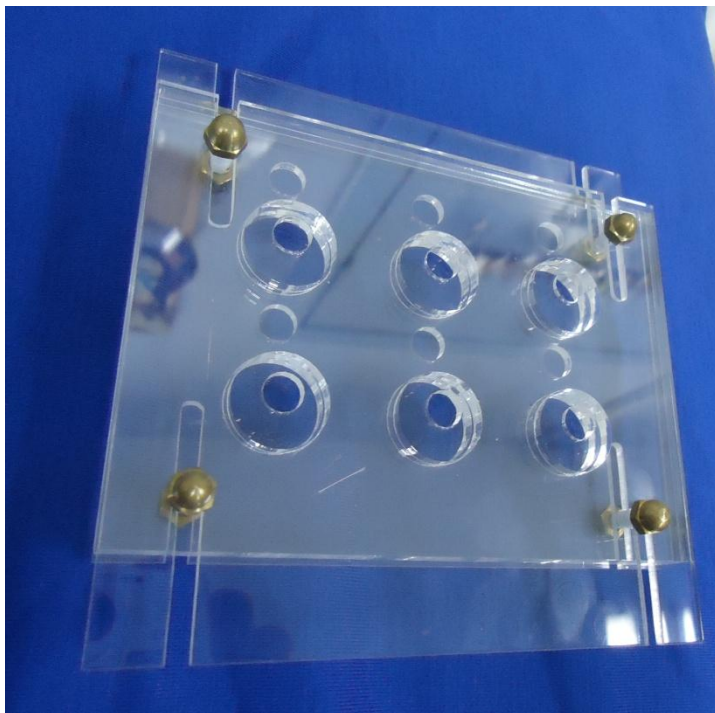
Para garantir que não houve aprendizado dos comportamentos, apenas animais virgens foram utilizados para os cruzamentos. Para isso, moscas recém-emergidas foram anestesiadas com CO<sub>2</sub>, separadas com o auxílio de microscópio estereoscópico de acordo com o sexo, acondicionadas em meios de cultura e armazenadas por 6 dias, quando



atingem o completo amadurecimento sexual e estão sexualmente aptas (Vanderlinde *et al.*, 2013).

A avaliação do comportamento de corte era sempre feita no período das 8 e as 11 horas da manhã, que por dados empíricos era o horário de maior atividade das moscas. Esta avaliação consistiu na observação direta de 200 casais de cada espécie. Para isso foi utilizado um equipamento chamado Copulatron (Figura 5), que consiste em seis câmaras para cópula divididas ao meio por uma divisória removível (Drapeau e Lomg, 2000).

**Figura 5.** Copulatron, um aparelho de seis câmaras utilizado para observação dos casais de *Drosophila*.



Primeiramente, com o auxílio de um aspirador de boca, as fêmeas de uma linhagem eram colocadas em um lado da câmara de cópula, e depois os machos da outra linhagem eram colocados no outro lado. Então, quando é retirada a divisória que separa os casais, é iniciada

a contagem do tempo. A observação durava o tempo máximo de 50 minutos ou o tempo de cópula do casal (Castrezana e Markow, 2008). Durante este teste eram cronometrados:

- Latência da corte: tempo entre a união do casal até o macho iniciar a corte.
- Corte: tempo de corte do macho até o início da cópula.
- Cópula: tempo que o macho fica montado sobre a fêmea.

Os comportamentos observados foram descritos e alguns cruzamentos filmados ou fotografados com câmera digital acoplada ao microscópio estereoscópico, como forma de documentar os comportamentos apresentados por estas moscas.

Ao término do tempo de observação os casais foram sacrificados com CO<sub>2</sub> e guardados em frascos com álcool 70% para posteriores análises morfométricas. As câmaras foram limpas com álcool 70% e secadas com algodão.

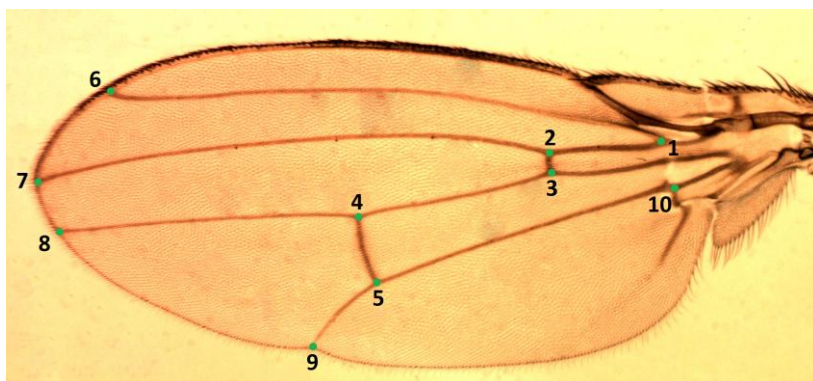
A normalidade dos tempos de latência, corte e cópula foi avaliada pelo teste de valores extremos no software BioEstat 5.3 (Instituto Mamirauá, 2014). Através destas análises, foram observados *outliers* e estes foram retirados a fim de melhor ajustar os valores à normalidade. As diferenças entre as proporções de casais que apresentaram comportamento de corte e os que não apresentaram, bem como entre os que tiveram sucesso de corte e os que não tiveram foram testadas por teste binomial, já as diferenças entre os tempos das espécies foi calculada através de teste t de Student, ambos no software STATISTICA 8.0 (Statsoft, 2001).

## 2.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Para estimar o tamanho dos indivíduos analisados, as asas dos casais que exibiram comportamento de corte foram dissecadas e fixadas em lâminas histológicas com balsamo do Canadá, sob lamínulas e visualizadas em microscópio (Boeco Germany). Ampliadas 10X, foram fotografadas utilizando o sistema de captura de imagem digital ScopeImage 9.0. Foram usadas preferencialmente as asas direitas nas análises de morfometria geométrica. Somente em casos de danos nesta asa, a asa esquerda foi utilizada.

Através do programa TPSdig2 (Rohlf, 2013), foram digitalizados dez pontos de referência em casa asa (Figura 6).

**Figura 6.** Foto da asa de *Drosophila polymorpha*, indicando os 10 pontos de referência utilizados para descrever a forma da asa nas análises morfométricas.



A medida de tamanho utilizado foi o centróide, calculado através da raiz quadrada da soma da distância entre cada ponto de referência ao quadrado e o centróide de cada asa (Dryden e Mardia, 1998).

A correlação do tamanho de machos e de fêmeas em casais que apresentaram sucesso de cópula e nos que não tiveram sucesso de cópula bem como a comparação entre o tamanho das asas dos machos que tiveram sucesso de corte com os que não obtiveram sucesso foram feitas por teste t de Student no STATISTICA 8.0 (Statsoft, 2001), utilizando 37 casais de *D. cardinoides* e 100 de *D. polymorpha* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Número de casais utilizados para análise morfométrica com e sem sucesso de corte.

	<i>D. cardinoides</i>	<i>D. polymorpha</i>
<b>Casais sem sucesso de cópula</b>	23	69
<b>Casais com sucesso de cópula</b>	14	31
<b>Total</b>	37	100



### 3 RESULTADOS

#### 3.1 O COMPORTAMENTO DE CORTE DE *Drosophila cardinoides* E *Drosophila polymorpha*

Foi observado um total de 400 casais, metade de *D. cardinoides* e a outra metade de *D. polymorpha* (Tabela 3). O número de casais de *D. cardinoides* em que o macho não iniciou corte foi maior que em *D. polymorpha*. Dos que iniciaram corte, a taxa de sucesso na cópula foi similar entre as espécies.

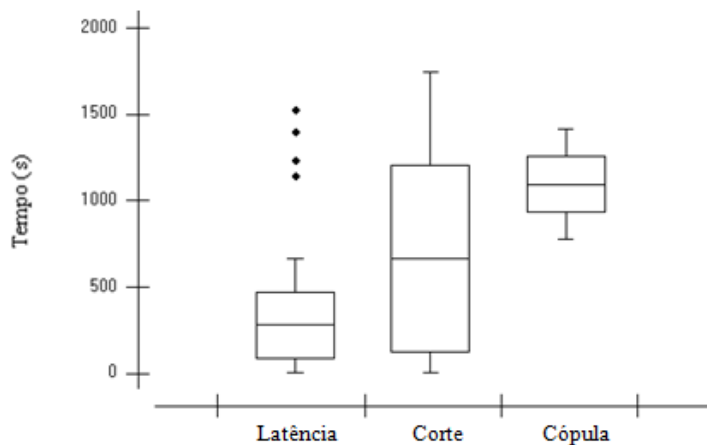
**Tabela 3.** Número de casais observados.

	<i>D. cardinoides</i>	<i>D. polymorpha</i>
<b>Machos que não apresentaram corte</b>	116 (58%)	20 (10%) *
<b>Machos que cortejaram e não tiveram sucesso de cópula</b>	43 (21,5%)	98 (49%) ns
<b>Machos que cortejaram e tiveram sucesso de cópula</b>	41 (20,5%)	82 (41%) ns
<b>Total</b>	200	200

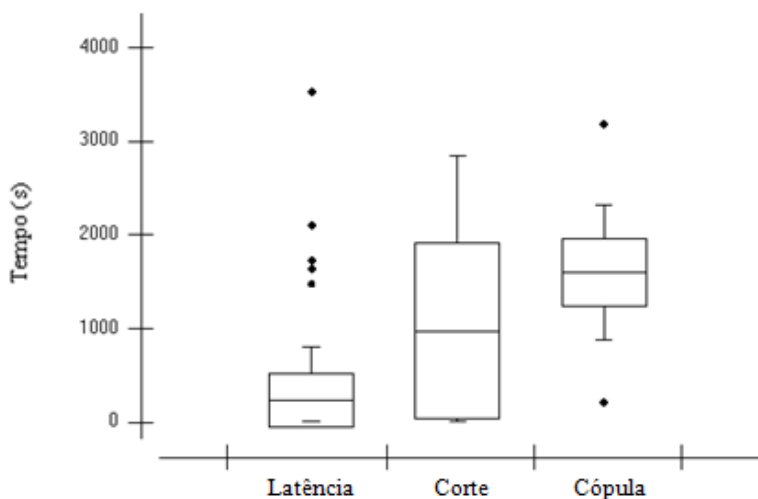
\* $P < 0,0001$

Quanto aos ajustamentos dos tempos de latência, corte e cópula à normalidade, nas duas espécies os tempos de corte e cópula se ajustaram à normalidade ( $p < 0,05$ ). Já os tempos de latência se ajustaram à normalidade após a retirada dos *outliers*, sendo os quatro casais com tempos acima de 1000 segundos em *D. cardinoides* (Figura 7), e seis casais acima de 1500 segundos em *D. polymorpha* (Figura 8).

**Figura 7.** *Box-plots* dos tempos de latência, corte e cópula de *D. cardinoides*. Linhas centrais representam a média, as caixas 1 desvio padrão e os bigodes 2 desvios-padrão.



**Figura 8.** *Box-plots* dos tempos latência, corte e cópula de *D. polymorpha*. Linhas centrais representam a média, as caixas 1 desvio padrão e os bigodes 2 desvios-padrão.



Nas duas espécies, os machos que conseguiram copular iniciaram a corte em tempos similares, ou seja, não há diferença nos tempos de latência (Tabela 4). Já os tempos de corte e cópula foram respectivamente 41% e 45% maiores em *D. polymorpha* ( $p < 0,05$ ), o que resultou em um tempo médio de acasalamento 34% maior que em *D. cardinoides*.

Entre os machos que não conseguiram copular, após a retirada dos valores com base nos mesmos critérios aplicados anteriormente, também não houve diferença no tempo de latência entre as duas espécies. Do mesmo modo, quando comparados os tempos de latência entre os machos que conseguiram e os que não conseguiram copular, não há diferença nos tempos.

**Tabela 4.** Médias dos tempos (em segundos) de latência, corte e cópula obtidos para casais que tiveram sucesso no acasalamento, com seus respectivos desvios padrões entre parênteses.

	<i>D. cardinoides</i>	<i>D. polymorpha</i>
<b>Latência</b>	279.35(156.46)	212.46 (243.20)
<b>Corte</b>	719.19 (538.20)	1018 (953.74)
<b>Cópula</b>	1084.89(158.57)	1580.16(383.46)
<b>Total</b>	2083.43 (589.10)	2810.62(972.83)

As observações realizadas permitiram a caracterização do comportamento de corte das espécies estudadas e estão detalhadas a baixo.

A quebra da latência ocorreu por toques das pernas anteriores do macho nas pernas da fêmea ou em seu abdômen. Em seguida, quando a fêmea permanecia parada, era observado o posicionamento do macho a frente da fêmea e posteriormente os tradicionais movimentos em círculo ao redor da fêmea. Esta movimentação sempre apresentou breves paradas para movimentos com as asas, eversão da proboscide e fricção das pernas e asas. Por sua vez, a fêmea passava parte deste tempo alisando suas asas e pernas anteriores e posteriores.

Após passar várias vezes na frente da fêmea, o macho posicionava-se atrás da fêmea, onde começava a lambe o seu

ovipositor. Os movimentos das asas eram frequentes mesmo quando o macho estava fora do campo de visão da fêmea. A aproximação do macho para lambe o ovipositor da fêmea foi considerado um momento crítico para a aceitação do macho, pois muitas vezes as fêmeas friccionavam as pernas posteriores, dando “pontapés” e acabavam por afastá-los. Quando isso acontecia, eles voltavam para frente da fêmea e repetiam os primeiros movimentos de corte, até o momento em que tentavam novamente se aproximar da fêmea. O contato com o ovipositor muitas vezes durava bastante tempo e este era o momento que precedia a subida do macho na fêmea.

Por outro lado, muitas vezes as fêmeas não ficavam paradas e faziam caminhadas pela câmara. A reação dos machos era segui-las até que as fêmeas exibissem os mesmos comportamentos descritos anteriormente.

Foi relativamente simples perceber quando o macho tentava a cópula, pois estes curvavam seus abdomens enquanto tentavam posicionar o tórax sobre o abdômen da fêmea. Este momento em que o macho tentava iniciar efetivamente a cópula era o segundo ponto crítico observado. Devido à instabilidade mecânica, foi observado que, os casais eventualmente, caíam para o lado e consequentemente a cópula não era efetivada. Nestes casos, o macho começava a corte desde os primeiros movimentos.

Após montar na fêmea e estabilizar a cópula, não foram mais observados movimentos do macho. As fêmeas, normalmente, ficavam paradas, mas eventualmente andavam pela câmara. Ao final do tempo de cópula, as fêmeas começavam a friccionar as pernas posteriores, o que tirava a estabilidade dos machos e propiciava o término do acasalamento.

Um grande número de cortes sem sucesso de cópula também foram observados. Assim foi possível observar padrão no comportamento de rejeição das fêmeas aos machos. Além da fricção das pernas posteriores, ao tentar se aproximar das fêmeas, elas esticavam as pernas traseiras de maneira a elevar o abdômen. Dessa forma os machos não conseguiam alcançá-lo.

Ao terminar a cópula, alguns casais se separavam e não mostravam qualquer tipo de interação. No entanto, por vezes, alguns machos imediatamente voltavam a cortejar as fêmeas, que sempre os rejeitavam imediatamente.

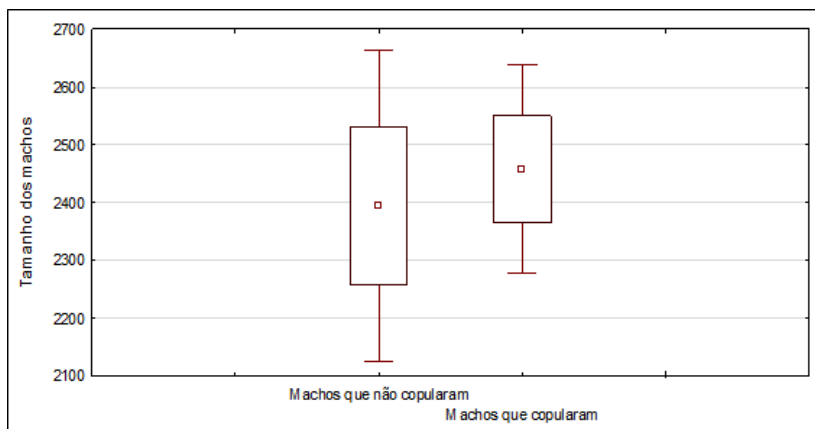


### 3.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS ASAS DOS CASAIS DE *Drosophila cardinoides* E *Drosophila polymorpha*

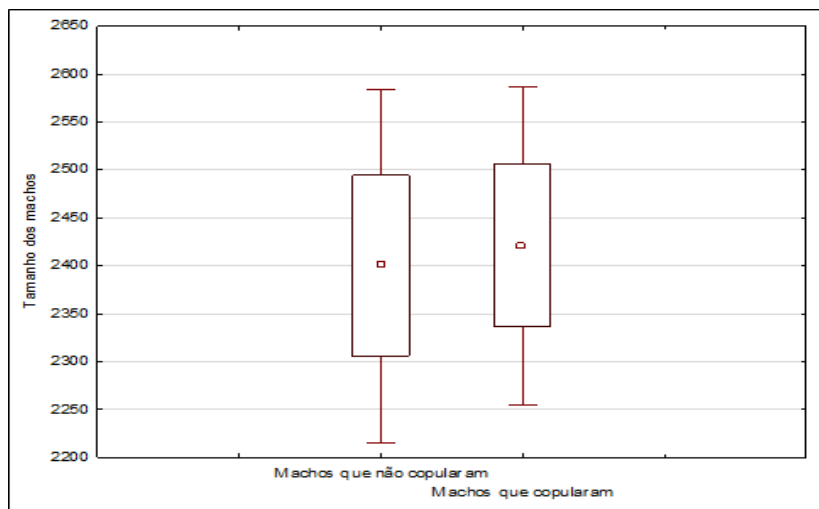
Dos 400 casais observados, 37 de *D. cardinoides* e 100 de *D. polymorpha* foram utilizados nas análises morfométricas. Foram usados 23 casais sem sucesso na cópula e 14 casais com sucesso de cópula de *D. cardinoides* e para *D. polymorpha* foram utilizados 69 casais que não tiveram sucesso na cópula e 31 casais que tiveram sucesso na cópula

Em geral, o tamanho médio dos machos que conseguiram copular foi similar ao dos que não conseguiram. Do mesmo modo, as correlações entre os tamanhos dos machos e das fêmeas em que existiu ou não a cópula foram não significativas nas duas espécies. Estes dados sugerem que não há influência do tamanho corporal do macho no sucesso reprodutivo.

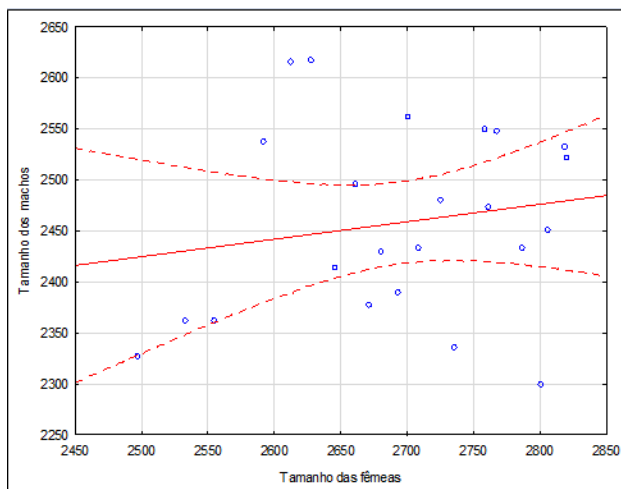
**Figura 9.** Tamanho entre machos de *D. cardinoides* que copularam e não copularam. Pontos centrais indicam a média, caixas indicam  $\pm 1$  desvio padrão, e bigodes indicam 1,96 desvio padrão.



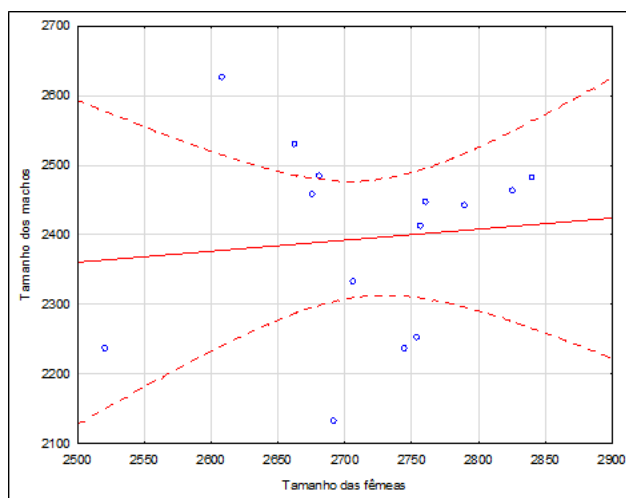
**Figura 10.** Correlação de tamanho entre machos de *D. polymorpha* que copularam e não copularam. Pontos centrais indicam a média, caixas indicam  $\pm 1$  desvio padrão, e bigodes indicam 1,96 desvio padrão.



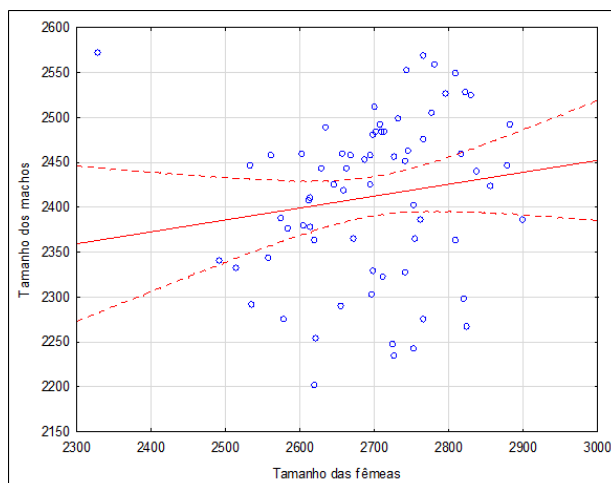
**Figura 11.** Correlação de tamanho entre os casais de *D. cardinoides* que não tiveram sucesso na cópula. A linha cheia indica a correlação e a tracejada representa o intervalo de confiança de 95%.



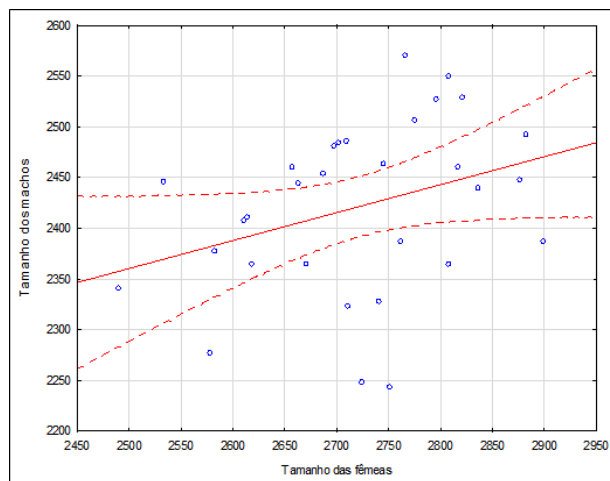
**Figura 12.** Correlação de tamanho entre os casais de *D. cardinoides* que tiveram sucesso na cópula. A linha cheia indica a correlação e a tracejada representa o intervalo de confiança de 95%.



**Figura 13.** Correlação de tamanho entre os casais de *D. polymorpha* que não tiveram sucesso na cópula. A linha cheia indica a correlação e a tracejada representa o intervalo de confiança de 95%.



**Figura 14.** Correlação de tamanho entre os casais de *D. polymorpha* que tiveram sucesso na cópula. A linha cheia indica a correlação e a tracejada representa o intervalo de confiança de 95%.



## 4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Na análise dos resultados aqui apresentados, é necessário se considerar que todos os testes foram realizados em laboratório sem chance de escolha, tanto masculina quanto feminina. Na natureza, muitos indivíduos de ambos os sexos podem estar presentes, o que poderia gerar resultados diferentes. Além disso, no ambiente natural, os indivíduos têm a capacidade de sair da arena de acasalamento, uma opção não oferecida aqui.

Através de dados empíricos vindos do manuseio do estoque do laboratório e do contato com estas moscas durante estes experimentos, se esperaria que *D. cardinoides* apresentasse tempos de corte e cópula menores do que *D. polymorpha*. Esta primeira espécie apresenta comportamento corajoso e explorador, se movimenta mais e tem prole mais numerosa, enquanto *D. polymorpha* parece ter o comportamento e estratégias exatamente opostas. Os dados deste trabalho vieram a confirmar esta expectativa. Em *D. melanogaster*, trabalhos antigos relatam médias de tempos de corte entre 2 e 3 minutos (Gromko, 1987) e 10 minutos (Cobb *et al.*, 1987), enquanto nossos resultados foram de 12 minutos para *D. cardinoides* e 17 minutos para *D. polymorpha*. Gromko e Markow (1993) comparam resultados de tempos de corte de *D. melanogaster* em populações naturais e em laboratório e observaram que, na primeira situação, os tempos são menores e apresentam mediana de 20 segundos de duração de corte. Cabe ressaltar que estes tempos não exprimem toda a variabilidade intraespecífica, principalmente em *D. polymorpha* que apresenta desvios padrões muito altos, o que indica a alta variabilidade da espécie possui, também neste caráter fenotípico.

Lasbleiz *et al.* (2006) mostram dados que indicam que o comportamento de corte e cópula dependem de uma interação complexa que implica na troca mútua de múltiplos sinais. Em especial, mostra que a fêmea desempenha papel crucial no que diz respeito ao sucesso da cópula, provavelmente emitindo estímulos que, tanto podem inibir, quanto estimular a corte masculina. As observações feitas no presente trabalho descrevem muitas destas interações e suportam a ideia da complexidade do comportamento.

Outro aspecto observado é que a diminuição da atividade de movimentação na arena antes da cópula raramente é relatada, na bibliografia, para as espécies de *Drosophila* já estudadas (Bastock, 1956; Manning, 1961; 1963; Cook, 1973; Markow e Hanson, 1981;

Tompkins *et al.*, 1982; Cobb *et al.*, 1985; Gailey *et al.*, 1986; Markow, 1987). Já para Lasbleiz *et al.* (2006) isto é óbvio, pois a diminuição drástica desta atividade ocorre pouco antes da cópula, e foi postulada como indicativo da receptividade da fêmea (Cook 1973; Tompkins *et al.*, 1982), o que demonstra o papel de escolha da fêmea, fundamental no sucesso da cópula. Os cruzamentos aqui realizados mostram que este é um comportamento comum para ambas as espécies estudadas.

Em linhagens de laboratório, o reconhecimento do companheiro envolve, pelo menos, a troca de estímulo visual, acústico, olfativo, além dos sinais táteis e gustativos (Schilcher, 1976; Antony e Jallon, 1982; Ewing, 1983; Robertson, 1983; Jallon, 1984; Tompkins, 1984; Ferveur, 1997; Tauber e Eberl, 2003; revisado em Greenspan e Ferveur, 2000). Estes sinais informam mutuamente sobre a identidade e a receptividade de um parceiro sexual potencial. Alguns desses estímulos atuam de forma a modular os comportamentos e sua importância pode variar entre espécies, subespécies ou populações (Cobb e Ferveur, 1996; Marcillac e Ferveur, 2004; Ferveur, 2005). Drosófilas podem simultaneamente usar estímulos visuais, auditivos e químicos para corte, portanto bloqueando apenas uma dessas modalidades sensoriais não há impedimento da corte e cópula (Markow, 1987).

O uso de múltiplos sinais sensoriais também pode ser relacionado à mudança temporal durante a corte. Observa-se que os estímulos visuais são utilizados nas fases de detecção e reconhecimento do companheiro, enquanto que os estímulos químicos e acústicos parecem mais potentes durante as fases posteriores da corte (Lasbleiz *et al.*, 2006).

Variabilidade intraespecífica tem sido encontrada, em várias espécies de *Drosophila*, para vários caracteres relacionados com a capacidade de acasalamento. A relação entre o comportamento de acasalamento bem sucedido e a percepção de estímulos visuais pode ser variável dentro, bem como entre, as espécies de *Drosophila*. Por exemplo, duas linhagens de *D. subpalustris* apresentaram níveis semelhantes de inseminação quando expostas à luz, contudo, no escuro, mostram diferentes respostas de acasalamento (Grossfield, 1971). A presença ou ausência de luz pode agir em sinergia com os fatores ambientais, como a alimentação, para revelar interações complexas entre o processamento da informação sensorial sexual e não sexual (Cobb e Ferveur, 1996).

Grossfield (1971) classificou as espécies de *Drosophila* como luz independente (Classe I: acasalamento ocorre igualmente bem no escuro e na luz), luz facilitado (Classe II: redução significativa nos cruzamentos no escuro, mas ainda ocorrem acasalamentos) ou dependentes de luz (Classe III: não acasalam no escuro).

Não há registros desse tipo de experimento para as espécies estudadas neste trabalho. No trabalho de Grossfield (1971), a única espécie do grupo *cardini* estudada foi *D. acutilabella*, que foi classificada na classe III. Isso nos leva a crer que *D. polymorpha* e *D. cardinoides* também deveriam estar nessa classe e, por tanto, serem dependentes de luz para seus acasalamentos. Um efeito da luz sobre o comportamento de acasalamento foi observado entre, e algumas vezes dentro, de quatro espécies do grupo *melanogaster*. A perda de fatores visuais parece, principalmente, diminuir o sucesso de acasalamento à curto prazo, mas não diminui o nível de inseminação (Cobb e Ferveur, 1996). Inicialmente pensamos que a dependência da luz para o acasalamento era uma evidência de que as fêmeas precisavam observar o tamanho dos machos, portanto o tamanho deles seria determinante para o sucesso da corte.

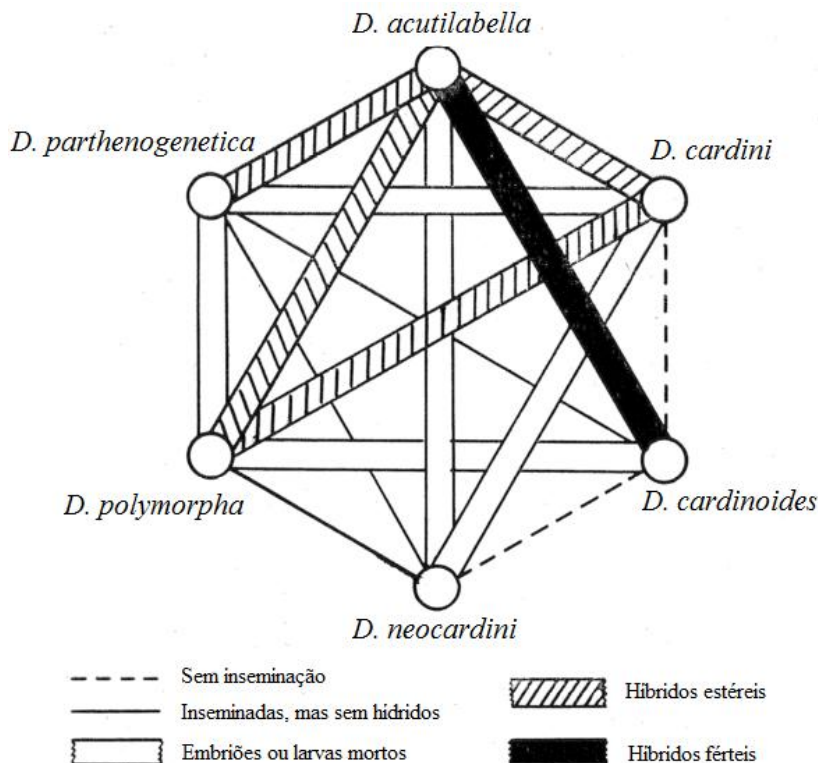
Outros estímulos visuais tais como exibição de asa ou o ângulo com que a asa é estendida podem ser cruciais para o sucesso reprodutivo, pois esses sinais são altamente específicos (Cobb *et al.*, 1985). O isolamento entre duas espécies de grupo *auraria*. (*D. Auraria* e *D. triauraria*) parece ser completo na escuridão, enquanto apenas parcial na luz (Oguma *et al.*, 1996). Assim, o isolamento pode estar relacionado com os diferentes sinais visuais usados por ambas as espécies.

Ao comparar os resultados de *D. willistoni* com as de *D. nebulosa*, é evidente que há evolução na importância dos vários sinais de corte nas diferentes espécies de *Drosophila*. A importância relativa dos sinais durante a corte difere entre estas espécies estreitamente relacionadas, o que sugere que a taxa de divergência é rápida. Portanto a corte pode contribuir para o isolamento reprodutivo e essa rápida divergência pode contribuir para o processo de especiação (Gleason *et al.*, 2012).

O isolamento parecer ser quase completo entre as duas espécies estudadas no presente trabalho (Streinsinger, 1946). Apesar dos registros de cópula e formação de híbridos entre *D. cardinoides* e *D.*

*polymorpha* (Figura 15), não há relatos de formação de híbridos viáveis (Stalker, 1953).

**Figura 15.** Diagrama de cruzamentos para o grupo *cardini* (Adaptado de Stalker, 1953).



Deve se destacar que todas as descrições de hibridização no grupo *cardini*, apesar de numerosas (Tabela 5), vêm de resultados de cruzamentos de isolinhagens em laboratórios (Stalker, 1953; Funtch, 1962; Takada, 1963). Não há esse tipo de registro vindo de populações naturais, o que torna a validade destes resultados questionável (Markow, 2000) e ressalta a importância de estudos como este, que utilizam linhagens recém vindas da natureza. As condições de confinamento das moscas podem propiciar cruzamentos que não aconteceriam



naturalmente. Assim, reforça-se a hipótese de que o isolamento reprodutivo seja muito próximo do completo dentro do grupo *cardini*,

**Tabela 5.** Sumário de cruzamentos intraespecíficos no grupo *cardini* (Adaptado de Stalker, 1953).

Females	Males	Number of Pairs	Insem. Females	Sperm	Hybrids
<i>D. cardinoides</i>					
Brazil.....	<i>D. cardini</i> , Florida.....	24	0/23	.....	none
Guatemala...	<i>D. cardini</i> , Florida.....	24	0/22	.....	none
Brazil.....	<i>D. acutilabella</i> , Florida.....	12	0/11	.....	none
Brazil.....	<i>D. parthenogenetica</i> .....	6	0/6	.....	none
Guatemala...	<i>D. parthenogenetica</i> .....	12	5/12	*, s	none
Guatemala...	<i>D. neocardini</i> , Brazil.....	18	0/16	.....	none
Guatemala...	<i>D. polymorpha</i> , Brazil.....	18	15/17	*, s	d. e.
<i>D. cardini</i>					
Florida.....	<i>D. cardinoides</i> , Guatemala..	6	0/6	.....	none
Florida-Cuba.	<i>D. cardinoides</i> , Brazil.....	28	0/27	.....	none
Florida-Cuba.	<i>D. acutilabella</i> , Florida.....	97	78/88	s, v	1 ♀
Florida-Cuba.	<i>D. neocardini</i> , Brazil.....	36	32/33	s	d. e.
Mexico.....	<i>D. neocardini</i> , Brazil.....	36	23/34	.....	d. e.
Florida-Cuba.	<i>D. polymorpha</i> , Brazil.....	72	61/64	*, s	5 ♂♂
Florida-Cuba.	<i>D. parthenogenetica</i> .....	24	19/21	s	d. e. y.
Mexico.....	<i>D. parthenogenetica</i> .....	12	8/11	s, v	d. e. y.
<i>D. acutilabella</i>					
Florida.....	<i>D. cardinoides</i> , Guatemala..	54	44/47	s, v	224 ♀♀, 2 ♂♂
Florida.....	<i>D. cardinoides</i> , Brazil.....	6	4/5	s, v	1 ♀
Florida.....	<i>D. cardini</i> , Florida.....	90	36/59	*, s	4 ♂♂
Florida.....	<i>D. parthenogenetica</i> .....	30	24/27	s	19 ♀♀
Florida.....	<i>D. polymorpha</i> , Brazil.....	72	59/62	s, v	20 ♀♀, 1 ♂
Florida.....	<i>D. neocardini</i> , Brazil.....	24	20/21	s	d. e.
<i>D. neocardini</i>					
Brazil.....	<i>D. cardinoides</i> , Guatemala..	12	0/12	.....	none
Brazil.....	<i>D. cardini</i> , Florida.....	54	0/48	.....	none
Brazil.....	<i>D. acutilabella</i> , Florida.....	18	0/17	.....	none
Brazil.....	<i>D. parthenogenetica</i> .....	18	0/18	.....	none
Brazil.....	<i>D. polymorpha</i> , Brazil.....	24	0/22	.....	none
<i>D. polymorpha</i>					
Brazil.....	<i>D. cardinoides</i> , Guatemala..	36	29/32	*, s	d. e.
Brazil.....	<i>D. cardini</i> , Florida-Cuba...	66	49/55	s	d. e. l.
Brazil.....	<i>D. acutilabella</i> , Florida.....	30	25/27	s	d. e.
Brazil.....	<i>D. parthenogenetica</i> .....	42	32/39	s	d. e. l.
Brazil.....	<i>D. neocardini</i> , Brazil.....	48	1/44	s	none

\*—Sperm grossly abnormal; s, sperm found in spermathecae; v, sperm found in ventral receptacles; d.e., death in eggs; d. e. l., death in eggs and larvae; d. e. y., death in eggs and young larvae.

caso contrário, como muitas destas espécies ocorrem em simpatria (Vilela *et al.*, 2002) esperar-se-iam capturas de indivíduos híbridos na natureza. Porém, também se esperaria que os híbridos, em situação natural tivessem viabilidade reduzida, o que reduziria as chances de sua coleta.

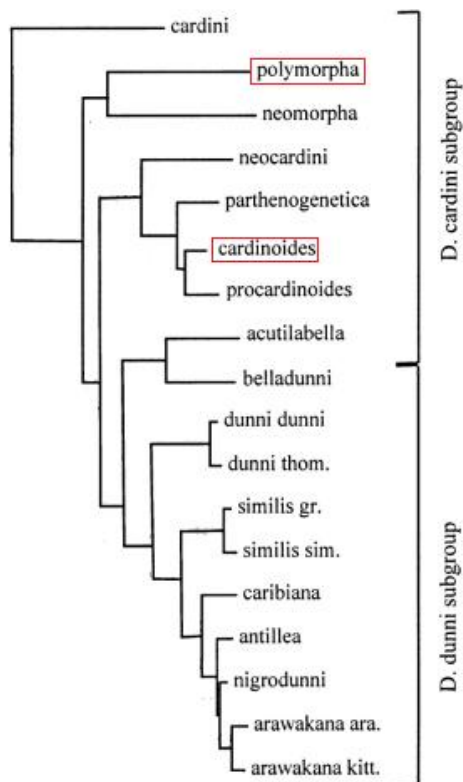
Outra questão importante a cerca deste assunto é que Coyne e Orr (1997) mostram em seu trabalho que o isolamento pré-zigótico evolui com muito mais rapidez em espécies simpátricas do que nas alopátricas. No caso de *D. cardinoides* e *D. polymorpha*, fica difícil defini-las como simpátricas, pois apesar de terem sobreposição na área de ocorrência, estas espécies ocupam diferentes nichos ecológicos, já que *D. polymorpha* ocupa preferencialmente áreas úmidas e interior de mata enquanto *D. cardinoides* tem preferência por áreas secas e clareiras, o que indica que deve haver isolamento ecológico entre essas espécies (Da Cunha *et al.*, 1953; Gottschalk *et al.*, 2007). Neste caso, a chance de encontros estaria restrita a uma área de distribuição marginal das duas espécies. Alguns estudos foram feitos sobre este tema e podem ser controversos, como os trabalhos de Kiliass *et al.* (1980) e Dodd (1989) que descreveram o desenvolvimento de isolamento pré-zigótico entre moscas criadas em diferentes ambientes, Mooers *et al.* (1999) e Rundle (2003) não encontraram nenhuma evidência de acasalamento entre as populações de *Drosophila* que habitam um novo ambiente e seus antepassados.

Sejam quais forem as barreiras que atuam no isolamento do grupo *cardini*, elas permanecem desconhecidas. Os trabalhos feitos com estas espécies exploraram apenas questões da morfologia das moscas e negligenciam outras barreiras reprodutivas como a divergência temporal, ecologia e comportamento (Coyne e Orr, 1997; Mallet, 2006). No entanto, as observações feitas neste trabalho corroboram com a possibilidade de hibridizações, pois, além das já conhecidas semelhanças morfológicas, (Stalker, 1953), estas espécies apresentam muitas semelhanças comportamentais na corte.

A multiplicidade de barreiras reprodutivas é certamente uma regra entre as espécies de *Drosophila* e os experimentos de cruzamentos não conseguem reproduzir com fidelidade esta diversidade de condições (Bizzo, 2011). Deste modo, o acúmulo de informações sobre a biologia destas espécies permite uma melhor compreensão sobre seu processo evolutivo.

Os comportamentos descritos para *D. cardinoides* e *D. polymorpha* permitem que sejam feitas generalizações para o subgrupo *cardini*, já as duas espécies pertencem à diferentes clados da árvore do grupo *cardini* (figura 16), o que nos indica que apesar da distância filogenética (Brisson *et al.*, 2006), o padrão de comportamento permanece conservado neste subgrupo. Ambas as espécies demonstraram ser extremamente convergentes e obedeceram aos comportamentos já descritos para o gênero de maneira similar. Isso não exclui a necessidade de futuros estudos acerca do comportamento de corte das demais espécies, mas alerta para que caso haja variações, estas devem ser pequenas e terem alguma participação no isolamento das espécies do grupo.

**Figura 16.** Árvore de consenso Bayesiano do grupo *cardini* com base em marcadores moleculares (Adaptado de Brisson *et al.*, 2006).



Nenhuma vez foi observado re-acasalamento, o que é consideravelmente bem estabelecido na literatura para *Drosophila* (Manning, 1967; Gromko *et al.*, 1984; Letsinger e Gromko, 1985; Scott, 1987; Chen *et al.*, 1988) já que alguns componentes químicos do esperma causam redução da receptividade da fêmea após a cópula (Scott, 1987), dessa forma, as fêmeas esperam até que tenham usado uma quantidade substancial dos espermatozoides da cópula anterior, armazenada na espermateca (Gromko e Markow, 1993). Isso pode ser evolutivamente importante, já que essa estratégia representa uma maneira dos machos evitarem a competição de espermatozoides. Este fato pode ser comprovado se, o tamanho, a viabilidade e a quantidade de espermatozoides não for diferente entre as espécies.

Outro aspecto analisado foi a questão ligada ao tamanho das moscas. Não encontramos resultados que apontam para uma correlação significativa de tamanho entre as asas de machos e das fêmeas, tanto nos casais que tiveram sucesso de cópula, quanto nos sem sucesso. Isso leva à rejeição de nossa hipótese anterior, de que machos maiores teriam mais vantagens no acasalamento e, portanto estaria havendo uma seleção sexual em prol de machos maiores.

Entretanto o tamanho do corpo do macho tem sido correlacionado com o sucesso no acasalamento em vários táxons de Insecta (Thornhill e Alcock, 1983). Em *Drosophila*, embora os comprimentos da asa e do tórax sejam considerados bons índices de tamanho corporal, os resultados de vários estudos que examinam a influência do tamanho do corpo sobre o sucesso no acasalamento foram inconclusivos. Usando o comprimento tórax como medida para o tamanho do corpo, alguns autores encontraram uma correlação positiva entre esta característica e sucesso de acasalamento.

Mais recentemente, Santos *et al.* (1992) observaram em *Drosophila buzzatii* que a escolha das fêmeas não depende do tamanho corporal dos machos, apesar das múltiplas vantagens conhecidas. Outros estudos também têm apresentado resultados contrastantes propondo que a relação entre o tamanho do corpo e o sucesso masculino é complexa e pode não ser tão forte como pensado inicialmente, sugerindo que a seleção sexual direcional para aumento do tamanho do corpo masculino não é universal em *Drosophila* (Steele e Partridge 1988; Zamudio *et al.* 1995. Nossos resultados somam-se a essa ideia, pois não observamos influência consistente do tamanho da asa no sucesso de acasalamento. Menezes *et al.* (2013) propõem que a forma da asa masculina é o

principal fator de influência para o sucesso no acasalamento, pois em seus resultados fêmeas, com mais frequência, selecionavam machos com asas mais alongadas e, em algumas casos, este efeito era ainda mais acentuado para machos menores. Para as espécies estudadas do grupo cardini esta relação é exatamente contrária, ou seja machos maiores tendem a ter asas mais alongadas.

Estudos examinaram a relação entre o comprimento da asa e sucesso acasalamento em *D. subobscura* e *D. malerkotliana* e concluíram que moscas com cópula mais rápida, têm asas mais longas do que moscas mais lentas e sem sucesso na cópula (Monclus e Prevosti, 1971; Naseerulla e Hegde, 1992; Hedge e Krishna, 1997). Aspi e Hoikkala (1995) observaram que machos de *D. littoralis* e *D. montana* com grandes asas produzem sons de corte mais eficazes do que aqueles com asas menores. No entanto, não fica claro se as variações do comprimento de asa relatadas nestes experimentos estão relacionadas ao sucesso de acasalamento, ou simplesmente refletem a variação do tamanho geral do corpo ou da forma da asa.

Uma possível maneira de que o tamanho da asa possa estar influenciando o sucesso de acasalamento é através da variação na produção de vibrações destas, durante a corte. Este som é um sinal espécie-específico e tem forte influência sobre o sucesso do acasalamento (Tauber e Eberl, 2003). Devida a preferências das fêmeas para vários traços do som (Hoikkala *et al.*, 1998; Ritchie *et al.*, 1999). Variações interespecíficas nesta característica são bem conhecidas (Hoikkala *et al.*, 1982; Tomaru *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 2001), mas não existem dados sobre a relação direta entre essas características e forma da asa.

A forma e tamanho de asa podem estar envolvidos no processo de isolamento reprodutivo como resultado da seleção sexual. Menezes *et al.* (2013) propõem que a importância da forma da asa está funcionalmente relacionada com o voo e os sons de corte. No entanto, a falta de estudos sobre o comportamento de corte relacionado com a forma da asa apenas nos permite várias extrapolações diferentes, sendo nenhuma conclusiva. Estes últimos autores destacam a necessidade de estudos para determinar os principais fatores do sucesso do acasalamento e, conseqüentemente, o isolamento sexual nas espécies estudadas.

Uma hipótese que ainda estamos testando é a de que os machos mais simétricos de *D. cardinoides* e *D. polymorpha* possuem maior

sucesso reprodutivo do que os não simétricos. Dados sobre a simetria masculina estão sendo produzidos e auxiliarão nos estudos para a compreensão dos mecanismos de isolamento no grupo *cardini*, levando ao melhor entendimento da evolução deste grupo.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, W. W. e KIM, Y. 2005. Sexual Isolation Between Sympatric and Allopatric Populations of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. **Behavior Genetics**, 35: 305-312.
- ASPI, J. e HOIKKALA, A. 1995. Male mating success and survival in the field with respect to size and courtship song characters in *Drosophila littoralis* and *Drosophila montana* (Diptera: Drosophilidae). **Journal of Insect Behavior**, 8: 67-87.
- ANTONY, C. e JALLON, J. M. 1982. The chemical basis for sex recognition in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, 28: 873-880.
- BASTOCK, M. 1956. A gene mutation which changes a behaviour pattern. **Evolution**, 10: 421-439.
- BIZZO, L.; VANDERLINDE, T.; WILDEMANN, B. e DE TONI, D. C. 2012. Technical adaptations of instant medium for *Drosophila*. **Drosophila Information Service**, 95: 121-122.
- BIZZO, L. E. M. 2011. Zona de contato secundário: simpatria entre duas espécies de *Drosophila*. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 134.
- BIZZO, N. M. V. 1983. Estudos sobre a biologia e isolamento reprodutivo em *Drosophila serido*. Universidade de São Paulo, São Paulo. 71.
- BOOKSTEIN, F. L. 1989. Principal warps: Thin-plate splines and the decomposition of deformations. **IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, 11: 567-585.
- BOOKSTEIN, F. L. 1997. Morphometric tools for landmarks data: geometry and biology. **Cambridge University Press**.
- BRISSON, J. A.; DE TONI, D. C.; DUNCAN I. e TEMPLETON, A. R. 2005. Abdominal pigmentation variation in *Drosophila polymorpha*:

geographic variation in the trait, and underlying phylogeography. **Evolution**, 59: 1046-1059.

BRISSON, J. A.; WILDER, J. e HOLLOCHER, H. 2006. Phylogenetic analysis of the cardini group of *Drosophila* with respect to changes in pigmentation. **Evolution**, 60: 1228-1241.

BROWN, R. G. B. 1965. Courtship Behaviour in the *Drosophila Obscura* Group. Part Ii. Comparative Studies. **Behaviour**, 25 (3-4): 281-322.

CASTREZANA, S. J. e MARKOW, T. A. 2008. Sexual isolation and matin propensity among allopatric *Drosophila mettleri* populations. **Behavior Genetics**, 38: 437-445.

CENZI DE RÉ, F.; LORETO, E. L. S e ROBE, L. J. 2010. Gene and species trees reveal mitochondrial and nuclear discordance in the *Drosophila cardini* group (Diptera: Drosophilidae). **Invertebrate Biology**, 129: 353-367.

CHEN, P. S.; STUMM-ZOLLINGER, E.; AIGAKI, T.; BALMER, J.; BIENZ, M. e BOHLEN, P. 1988 A male accessory gland peptide that regulates reproductive behavior of female *D. melanogaster*. **Cell**, 54: 291-298.

COBB, M.; BURNET, B. e CONNOLLY, K. 1985. The structure of courtship in the *Drosophila melanogaster* species subgroup. **Behaviour**, 97: 182-212.

COBB, M.; BURNET, B.; BLIZARD, R. e JALLON, J. M. 1989. Courtship in *Drosophila sechellia*: its structure, functional aspects and relationship to that of other members of the *D. melanogaster* species subgroup. **Journal of Insect Behavior**, 2: 63-89.

COBB, M.; CONNOLLY, K. e BURNET, B. 1987 The relationship between locomotor activity and courtship in the *melanogaster* species sub-group of *Drosophila*. **Animal Behavior**, 35: 705-713.



COBB, M. e FERVEUR, J. F. 1996. Evolution and genetic control of mate recognition and stimulation in *Drosophila*. **Behavioural Processes**, 35: 35-54.

COOK, R. M. 1973. Courtship processing in *Drosophila melanogaster*. I. Selection for receptivity of wingless males. **Animal Behaviour**, 2: 338-348.

COYNE, J. A. e ORR, H. A. 1989. Patterns of speciation in *Drosophila*. **Evolution**, 43: 362-381.

COYNE, A. J. e ORR, H. A. 1997. Patterns of speciation in *Drosophila* Revisited. **Evolution**, 51: 295-303.

COYNE, J. A. e ORR, H. A. 2004. **Speciation**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 545.

DA CUNHA, A. B.; BRNCIC, D e SALZANO, F. M. 1953. A comparative study of chromosomal polymorphism in certain South American species of *Drosophila*. **Heredity**, 7: 193- 202.

DA CUNHA, A. B.; DOBZHANSKY, T. e PAVLOVSKY, O. SPASSKY, B. 1959 Genetics of natural populations. XXVIII. Supplementary data on the chromosomal polymorphism *In: Drosophila willistoni* in its relation to the environment. **Evolution**, 13: 389-404.

DA CUNHA, A. B. e DOBZHANSKY, T. 1954. A further study of chromosoma polymorphism in *Drosophila willistoni* in its relation to invironment. **Evolution**, 8: 119-134.

DA CUNHA, A. B.; BURLA, H. e DOBZHANSKY, T. 1950. Adaptative chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. **Evolution**, 4: 212 -235.

DE TONI, D. C.; HERÉDIA, F. e VALENTE, V. L. S. 2001. Chromosomal variability of *Drosophila polymorpha* populations from Atlantic Forest of continental and insular environments in State of Santa Catarina, Brazil. **Caryologia**, 54: 329-337.

DE TONI, D. C.; BRISSON, J. A.; HOFMANN, P. R. P.; MARTINS, M. e HOLLOCHER, H. 2005. First record of *Drosophila parthenogenetica* and *D. neomorpha*, *cardini* group, Heed, 1962 (*Drosophila*, Drosophilidae), in Brazil. **Drosophila Infortion Service**, 88: 33-38.

DOBZHANSKY, T. 1937. **Genetics and the origin of species**. New York: Columbia University Press.

DOBZHANSKY, T. 1943. Genetics of natural populations. IX. Temporal changes in the composition of populations. **Genetics**, 28: 162-186.

DOBZHANSKY, T. 1947a. Adaptative changes induced by natural selection in the wild populations of *Drosophila*. **Evolution**, 1: 1-16.

DOBZHANSKY, T. 1947b. A directional change in the genetic constitution of the natural population of *Drosophila pseudoobscura*. **Heredity**, 1: 53-54.

DOBZHANSKY, T. 1948. Genetics of natural population. XVI. Altitudinal and seasonal changes produced by natural selection in certain population of *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. **Genetics**, 33: 158-176.

DOBZHANSKY, T. e PAVAN, C. 1943. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. **Boletim da Faculdade de Filosofia e Ciências de São Paulo**, 36: 7-72.

DOBZHANSKY, T. e LEVENE, H. 1948. Genetics of natural populations. XVII. Proof of operation of natural selection in the wild populations. **Genetics**, 33: 537-547.

DOBZHANSKY, T. e LEVENE, H. 1951. Development of heterosis through natural selection in experimental population of *Drosophila pseudoobscura*. **The American Naturalist**, 85: 247-264.

DOCKENDORFF, T. C.; SU, H. S.; MCBRIDE, S. M.J.; YANG, Z.; CHOI, C. H.; SIWICKI, K. K.; SEHGAL, A. e JONGENS, T. A. 2002.

*Drosophila* lacking *dfmr1* activity show defects in circadian output and fail to maintain courtship interest. **Neuron**, 3: 973-984.

DODD, D. M. B. 1989. Reproductive isolation as a consequence of adaptive divergence in *Drosophila pseudoobscura*. **Evolution**, 43: 1308-1311.

DRAPEAU, M. D. e LONG, A. D. 2000. The Copulatron, a multi-chamber apparatus for observing *Drosophila* courtship behaviors. **Drosophila Information Service**, 83: 194-196.

DRYDEN, I. L. e MARDIA, K. V. 1998. Statistical shape analyses. Wiley.

DUBININ, N. P. e TINIAKOV, G. G. 1945. Seasonal cycles and the concentration of inversions in populations of *Drosophila funebris*. **American Naturalist**, 79: 570-572.

EWING, A. W. 1983. Functional aspects of *Drosophila* courtship. **Biology Review**, 58: 275-292.

FERVEUR, J. F. 1997. The pheromonal role of cuticular hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*. **Bioessays**, 19: 353-358.

FERVEUR, J. F. 2005. Cuticular hydrocarbons: their evolution and roles in *Drosophila* pheromonal communication. **Behavior Genetics**, 35: 279-295.

FREEMAN, S. e HERRON, J. C. 2009. **Análise Evolutiva**. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, 831.

FREIRE-MAIA, N. e PAVAN, C. 1949. Introdução ao estudo da *Drosophila*. **Cultus** 5: 1-71.

FUTCH, D. G. 1962. Hybridization studies within the cardini species group of the genus *Drosophila*. **The university of Texas Publications**, 6205: 539-554.

GAILEY, D. A.; LACAILLADE, R. C. e HALL, J. C. 1986. Chemosensory elements of courtship in normal and mutant, olfaction deficient *Drosophila melanogaster*. **Behavior Genetics**, 16: 375-405.

GANTER, G. K.; DESILETS, J. B.; DAVIS-KNOWLTON, J. A.; PANAITIU, A. E.; SWEEZY, M.; SUNGAIL, J.; TAN, L. C. H. ; ADAMS, A. M.; FISHER, E. A.; O'BRIEN, J. R. M.; KINCAID, K. M. e HEINRICH, R. 2012. *Drosophila* female pre-copulatory behavior is modulated by ecdysteroids. **Journal of Insect Physiology**, 58: 413-419.

GLEASON, J. M.; PIERCE, A. A.; VEZEAU, A. L. e GOODMAN, S. F. 2012. Different sensory modalities are required for successful courtship in two species of the *Drosophila willistoni* group. **Animal Behavior**, 83: 217-227.

GOTTSCHALK, M. S.; DE TONI, D. C.; VALENTE, V. L. S. e HOFMANN, P. R. P. 2007. Changes in Brazilian Drosophilidae (Diptera) assemblages across an urbanisation gradient. **Neotropical Entomology**, 36: 848-862.

GREENSPAN, R. J. e FERVEUR, J. F. 2000. Courtship in *Drosophila*. **Annual Review of Genetic**, 34: 205-232.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C. e CAROLL, S. B. 2008. **Introdução à Genética**. 9ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 712.

GROMKO, M. H.; NEWPORT, M. E. A. e KORTIER, M. G. 1984. Sperm dependence of female receptivity to remating in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, 38: 1273-1282

GROMKO, M. H. 1987. Genetic constraint on the evolution of courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. **Heredity**, 58: 435-441.

GROMKO, M. H. e MARKOW, T. A. 1993 Courtship and remating in Field populations of *Drosophila*. **Animal Behaviour**, 45: 253-262.

GROSSFIELD J. 1966. The influence of light on the mating behavior of *Drosophila*. **The University of Texas Publications**, 3: 147-176.

- HATFIELD, T. E SCHULTER, D. 1999. Ecological speciation in sticklebacks: environment-dependent hybrid fitness. **Evolution**, 53: 866-873.
- HEBETS, E. A. e PAPAJ, D. R. 2005. Complex signal function: developing a framework of testable hypotheses. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 57: 197-214.
- HEED, W. B. e KRISHNAMURPHY, N. B. 1959. Genetic studies on the Cardini group of *Drosophila* in the West Indies. **The University of Texas Publications**, 5914: 155-178.
- HEED, W. B. 1962. Genetic characteristics of island populations. . **The University of Texas Publications**, 6205: 173-206.
- HEED, W. B. e RUSSEL, J. S. 1971. Phylogeny and population structure in island and continental species of the *cardini* groups of *Drosophila* studied by inversion analysis. **The university of Texas Publications**, 7103: 91-130.
- HEDGE, S. N. e KRISHNA, M. S. 1997. Size-assortative mating in *Drosophila malerkotliana*. **Animal Behaviour**, 54: 419-426.
- HEDGE, S. N. e KRISHNA, M. S. 1999. Body size and fitness characters in *Drosophila malerkotliana*. **Current Science**, 77: 178-179.
- HOIKKALA, A.; LAKOVAARA, S. e ROMPPAINEN, E. 1982. **Mating behavior and male courtship sounds in the *Drosophila virilis* group**. New York: Plenum.
- HOIKKALA, A.; ASPI, J. e SUVANTO, L. 1998. Male courtship song frequency as an indicator of male genetic quality in an insect species, *D. montana*. **Proceedings of the Royal Society B**, 265: 503-508.
- HOLLOCHER, H.; HATCHER, J. L. e DYRESON E. G. 2000. Evolution of abdominal pigmentation differences across species in the *Drosophila dunni* subgroup. **Evolution**, 54: 2046-2056.

HOLLOCHER, H.; HATCHER, J. L. e DYRESON E. G. 2000. Genetic and developmental analysis of abdominal pigmentation differences across species in the *Drosophila dunni* subgroup. **Evolution**, 54: 2057-2071.

INSTITUTO MAMIRAUÁ. 2014. BioEstat 5.3. In: <http://www.mamiraua.org.br>.

JALLON, J. M. 1984. A few chemical words exchanged by *Drosophila* during courtship and mating. **Behavior Genetics**, 14, 441-478.

JENNIONS, M. D. e PETRIE, M. 1997. Variation in mate choice and mating preferences : a review of causes and consequences. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, 72: 283-327.

KILIAS, G.; ALAHOTUS, S. N. e PELECANOS, M. 1980. A multifactorial genetic investigation of speciation theory using *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, 34: 730-737.

LASBLEIZ, C.; FERVEUR, J e EVERAERTS, C. 2006. Courtship behavior of *Drosophila melanogaster* revisited. **Animal Behavior**, 7: 1001-1012.

LETSINGER, J. T. e GROMKO, M. H. 1985. The role of sperm number in sperm competition and female remating in *Drosophila melanogaster*. **Genetica**, 66: 195-202.

MACHADO, L. P. B.; CASTRO, J. P. e MADI-RAVAZZI, L. 2002. Evolution of the courtship and the hybrid male sterility among *Drosophila buzzatii* cluster species (Diptera, Drosophilidae). **Brazilian Journal of Biology**, 62: 601-608.

MACHADO, M. X.; DE TONI, D. C.e. HOFMANN, P. R. P. 2001. Abdominal pigmentation polymorphism of *Drosophila polymorpha* (Dobzhansky and Pavan, 1943) collected on Ilha de Santa Catarina and neighboring islands. **Biotemas**, 14: 87-107.

MALLET, J. 2006. What does *Drosophila* genetics tell us about speciation? Trends in **Ecology and Evolution**, 21: 386-393.

MANNING, A. 1961. The effects of artificial selection for mating speed in *Drosophila melanogaster*. **Animal Behaviour**, 9: 82-92.

MANNING, A. 1963. Selection for mating speed in *Drosophila melanogaster* based on the behaviour of one sex. **Animal Behaviour**, 11: 116-120.

MANNING, A. 1967. The control of sexual receptivity in female *Drosophila melanogaster*. **Animal Behaviour**, 15: 239-250.

MARCILLAC, F. e FERVEUR, J. F. 2004. A set of female pheromones affects reproduction before, during and after mating in *Drosophila*. **Journal of Experimental Biology**, 207: 3927-3933.

MARKOW, T. A. 1987. Behavioral and sensory basis of courtship success in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 84: 6200-6204.

MARKOW, T. A. 2000. Forced matings in natural populations of *Drosophila*. **The American Naturalist**, 156: 100-103.

MARKOW, T. A. e HANSON, S. 1981. Multivariate analysis of *Drosophila* courtship. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 78: 430-434.

MARKOW, T. A e O'GRADY, P. 2008. Reproductive ecology of *Drosophila*. **Functional Ecology**, 22: 747-759.

MARTINEZ, M. N. e CORDEIRO, A. R.. 1970. Modifiers of color pattern genes in *Drosophila polymorpha*. **Genetics**, 64: 573-587.

MAYR E. 1963. *Animal species and evolution*. Cambridge. Harvard University Press, 797.

MENEZES, B. F.; VIGODER, F. M.; PEIXOTO, A. A.; VARALDI, J. e BITNER-MATHÉ, B. C. 2013. The influence of male wing shape on mating success in *Drosophila melanogaster*. **Animal Behaviour**, 85: 1217-1223.

MONCLUS, M. e PREVOSTI, A. 1971. The relationship between mating speed and wing length in *Drosophila subobscura*. **Evolution**, 25: 214-217.

MOOERS, A.; RUNDLE, H. D. e WHITLOCK, M. C. 1999. The effects of selection and bottlenecks on male mating success in peripheral isolates. **American Naturalist**, 153: 437-444.

MÜLLER, M. L.; MENDONÇA, M. P.; OLIVEIRA, L. P. L. DE, VALENTE, V. L. S. E VALIATI, V. H. 2012. Courtship Behavior of *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) from Populations Colonizing South America. **Neotropical Entomology**, 42: 1415-1422.

NAPP, M. e. CORDEIRO, R.. 1981. Interspecific relationships in the *cardini* group of *Drosophila* studied by electrophoresis. **Revista Brasileira de Biologia**, 4: 537-547.

NASEERULLA, M. K. e HEDGE, S. N. 1992. Relationships between wing size and mating speed in *Drosophila malerkotliana*. **Italian Journal of Zoology**, 59: 367-370.

NAVARRO, A. e BARTON, N. H. 2003 Accumulating postzygotic isolation genes in parapatry: a new twist on chromosomal speciation. **Evolution**, 57: 447-459.

NOOR, M. A. F.; GRAMS, K. L.; BERTUCCI, L. A. e REILAND, J. 2001. Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98: 12084-12088.

OGUMA, Y.; JALLON.; J. M.; TOMARU, M. e MATSUBAYASHI, H. 1996. Courtship behavior and sexual isolation between *Drosophila auraria* and *D. triauraria* in darkness and light. **Journal of Evolutionary Biology**, 9: 803-815.

PARTRIDGE, L.; EWING, A. e CHANDLER, A. 1987. Male size and mating success in *Drosophila melanogaster*: the role of male and female behaviour. **Animal Behaviour**, 35: 555-562.



PATTERSON, J. e STONE, W. 1952. **Evolution in the Genus *Drosophila***. New York: Mamillan Co.

PAYANT, V. 1986. Le polymorphisme de La coloration abdominale dans Le genre *Drosophila*. **Ann Biology**, 25: 285-307.

POLEJACK, A. e TIDON, R. 2007. Learning of courtship components in *Drosophila mercatorum* (Paterson & Wheller) (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, 51: 82-86.

RIESEBERG, L. H. 2001 Chromosomal rearrangements and speciation. **Trends in Ecology and Evolution**, 16: 351-358.

RITCHIE, M. G.; HALSEY, E. J. e GLEASON, J. M. 1999. *Drosophila* song as a species-specific mating signal and the behavioural importance of Kyriacou & Hall cycles in *D. melanogaster* song. **Animal Behaviour**, 58: 649-657.

ROBE, L. J.; VALENTE, V. L.; BUDNIK, M. e LORETO, E. L. 2005. Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 36: 623-640.

ROBERTSON, H. M. 1983. Mating behaviour and the evolution of *Drosophila mauritiana*. **Evolution**, 37: 1283-1293.

ROHDE, C. e VALENTE, V. L. S. 1996. Citological maps and chromosomal polymorphism of *Drosophila polymorpha* and *Drosophila cardinoides*. **Revista brasileira de Genética**, 19(1): 27-32.

ROHLF, F. J. 2013. TPSDIG – Digitize landmarks and outlines. In: Department of Ecology and evolution, State university of new York at Stony brook.

ROHLF, F. J. e MARCUS, L. F. 1993. A revolution in morphometrics. **Trends in Ecology and Evolution**, 8: 129-129.

ROHLF, F. J. e SLICE, D. 1993. Extensions of the Procrustes method for optimal superimposition of landmarks. **Systematic Zoology**, 39: 40-59.

RUNDLE, H. D. 2003. Divergent environments and population bottlenecks fail to generate premating isolation in *Drosophila pseudoobscura*. **Evolution**, 57: 2557-2565.

RUNDLE, H. D.; NAGEL, L.; BOUGHMAN, W. J. e SCHUKTER, D. 2000. Natural selection and parallel speciation in sympatric stickbacks. *Science*, 287: 306-308.

SANTOS, M.; RUIZ, A.; BARBADILHA, A.; QUEZADA-DIAZ, J. E.; HASSON, E. e FONTEDEVILLA, A. 1988. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii* XIV. Larger flies mate more often in nature. **Heredity**, 61: 255-262.

SANTOS, M.; RUIZ, A.; QUEZADA-DIAZ, J. E.; BARBADILHA, A. e FONTEDEVILLA, A. 1992. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*: XX Positive phenotypic covariance between field adult fitness components and body size. **Journal of Evolutionary Biology**, 5: 403-422.

SCHILCHER, F. 1976. The role of auditory stimuli in the courtship of *Drosophila melanogaster*. **Animal Behaviour**, 24: 18-26.

SCHMITZ, H. J. 2010. Genética, ecologia e evolução de drosofilídeos (Insecta, díptera) associados a flores. Universidade Federal do Rio Grnade do Sul. 190.

SCOTT, D. 1987. The timing of the sperm effect on female *Drosophila melanogaster* receptivity. **Animal Behaviour**, 35: 142-149.

SNUSTAD, D. P. e SIMMONS, M. J. 2008. **Fundamentos de Genética**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 903.

SOKOLOWSKI, M. B. 2001. *Drosophila*: genetics meets behavior. **Nature reviews**, 2: 879-890.

STALKER, H. D. e CARSON, H. L. 1948. An altitudinal transect of *Drosophila robusta* Sturtevant. **Evolution**, 2: 295-305.

STALKER, H. D. 1953. Taxonomy and hybridization in the *cardini* group of *Drosophila*. **Annals Entomological society of America**, 46: 343-358.

STATISOFT. 2001. Statistica. In: <http://www.statsoft.com>

STEELE, R. H. e PARTRIDGE, L. 1988. A courtship advantage for small males in *Drosophila subobscura*. **Animal Behaviour**, 36: 1190-1197.

STREISINGER, G. 1946. The *cardini* species group of the genus *Drosophila*. **Journal of the New York entomological Society**, 54: 105-113.

STURTEVANT, A. H. 1942. The classification of the genus *Drosophila* with descriptions of nine new species. **University of Texas Publications**, 4213: 5-51.

SWEIGART, A. L. 2010. Simple Y-autosomal incompatibilities cause hybrid male sterility in reciprocal crosses between *Drosophila virilis* and *D. Americana*. **Genetics**, 184: 779-789.

TAKADA, H. 1963. Genitalia of F1-hybrids within the *cardini* species group of *Drosophila*. **Annotationes Zoologicae Japonenses**, 36: 208-217.

TAUBER, E. e EBERL, D. F. 2003. Acoustic communication in *Drosophila*. **Behavioural Processes**, 64: 211-223.

THORNHILL, R. e ALCOCK, J. 1983. **The Evolution of Insect Mating Systems**. Cambridge: Harvard University Press.

TIDON, R. e SENE, F. M. 1988. A trap that retains and keeps *Drosophila* alive. **Drosophila Information Service**, 67: 89-90.

TOMARU, M.; MATSUBAYASHI, H. e OGUMA, Y. 1995. Heterospecific interpulse intervals of courtship song elicit female rejection. **Animal Behaviour**, 50: 905-914.

TOMPKINS, L. 1984. Genetic analysis of sex appeal in *Drosophila*. **Behavior Genetics**, 14: 411-440.

TOMPKINS, L.; GROSS, A.; HALL, J. C.; GAILEY, D. e SIEGEL, R. W. 1982. The role of female movement in the sexual behavior of *Drosophila melanogaster*. **Behavior Genetics**, 12: 295-307.

VANDERLINDE, T.; WILDEMANN, B.; BIZZO, L. e DE TONI, D. C. 2013. *Drosophila polymorpha* life cycle. **Drosophila Information Service**, 96: 147-150.

VIA, S.; BOUCK, A. C. e SKILLMAN, S. 2000 Reproductive isolation between divergente races of pea aphids on two hosts. II. Selection against migrants and hybrids in the parental environments. **Evolution**, 54: 1626-1637.

VILELA, C. R., SILVA, A. F. G. e SENE, F. M. 2002. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. III. The *cardini* group. **Revista Brasileira de Entomologia**, 46: 139-148.

WHEELER, M. R. e KAMBYSELLIS M. P. 1966. Notes on the Drosophilidae (Diptera) of Samoa. **University of Texas Publications**, 6615: 533-556.

WILDEMANN, B. e DE TONI D. C. 2011. Analysis of inversion polymorphism and new inversion recorded in *Drosophila polymorpha* in the South of Florianopolis, Santa Catarina, Brazil. **Drosophila Information Service**, 94: 94-98.

WILKINSON, G. S. 1987. Equilibrium analysis of sexual selection in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, 41: 11-21.

WILLIAMS, M. A.; BLOUIN, A. G. e NOOR, M. A. F. 2001. Courtship songs of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. II. Genetics of species differences. **Heredity**, 86: 68-77.

WING, H. 1965. Interspecific hybridization between the six cryptic species of *Drosophila willistoni* group. **Heredity**, 20: 9-19.

YENISETTI, S. C. e HEDGE, S. N. 2003. Size-related mating and reproductive success in a drosophilid: *Phorticella striata*. **Zoological Studies**. 4: 203-210.

ZAMUDIO, K. R.; HUEY, R. B. e CRILL, W. D. 1995. Bigger isn't always better: body size, developmental and parental temperature and male territorial success in *Drosophila melanogaster*. **Animal Behaviour**, 49: 671-677.